

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**CONSECUENCIAS NEUROLÓGICAS DE LA
INHIBICIÓN SOSTENIDA DE GSK-3 EN
CEREBRO ADULTO**

Raquel Gómez Sintés
Madrid, 2009

Memoria de Investigación presentada por
Raquel Gómez Sintés
Para optar al grado de
Doctora en Ciencias
por la **Universidad Autónoma de Madrid**

Trabajo dirigido por el
Dr. José Javier Lucas Lozano
Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC)

La presente tesis ha sido realizada en el
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
(CSIC-UAM)
El laboratorio del Dr. Lucas también forma parte del
Centro de Investigación Biomédica en Red
para Enfermedades Neurodegenerativas
(CiberNed)





Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 1 de Junio de 2009

José Javier Lucas Lozano, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y del Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed)

INFORMA

Que la presente tesis doctoral titulada “*Consecuencias neurológicas de la inhibición sostenida de GSK-3 en cerebro adulto*” ha sido realizada bajo mi dirección por *Doña Raquel Gómez Sintes*.. Considero que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendido como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor.

El director de la tesis.

Dr. José Javier Lucas Lozano

A mis padres

A mis abuelos

A mis hermanas

A Rober

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	19
II. RESUMEN / SUMMARY	25
III. INTRODUCCIÓN	31
1. Glucógeno Sintasa Quinasa – 3	33
1.1 Descubrimiento de GSK-3	33
1.2 Regulación de GSK-3	34
1.2.1 Inactivación por fosforilación en serina	35
1.2.2 Fosforilación en tirosina	36
1.2.3 Formación de complejos	37
1.3 Rutas en las que participa GSK-3	38
1.3.1 Papel en la ruta de Wnt	38
1.3.2 Papel en la ruta de señalización por Insulina-IGF-1	39
1.4 Funciones en las que está implicada GSK-3	40
1.4.1 Decisión del destino celular en el desarrollo embrionario temprano	41
1.4.2 Regulación metabólica	42
1.4.3 Estructura del citoesqueleto	42
1.4.4 Apoptosis	43
2. GSK-3 como posible diana terapéutica en patologías humanas	46
2.1 Enfermedad de Alzheimer	46
2.2 Trastorno bipolar	49
2.3 Esquizofrenia	52
2.4 Enfermedad de Huntington	55
2.5 Diabetes tipo 2	56
2.6 Cáncer	57
3. Relevancia terapéutica de los inhibidores de GSK-3	58
3.1 Indicios y ejemplos de utilidad en diversas patologías	58
3.2 Evidencias de posibles efectos adversos de los inhibidores de GSK-3	62
IV. OBJETIVOS	65

V.	MATERIALES Y MÉTODOS	69
1.	Reactivos	71
2.	Oligonucleótidos y reacción en cadena de la polimerasa	71
3.	Anticuerpos	72
4.	Clonación del gen DN-GSK-3 en el plásmido pBI-3	72
5.	Generación de ratones R85TetO	74
6.	Mantenimiento de la colonia de ratones	74
	-Tratamiento con doxiciclina	
	-Tratamiento con litio	
7.	Inmunohistoquímica	75
8.	Inmunofluorescencia	76
9.	TUNEL	76
10.	Análisis de proteínas por electrotransferencia e inmunodetección (Western Blot)	77
11.	Ensayo de actividad quinasa de GSK-3	77
12.	Tests de comportamiento	78
	- Locomoción en campo abierto	
	- Rota-rod	
	- Test de la barra vertical	
	- Test del patrón de huellas	
	- Análisis del patrón de huellas por imagen digital (DigiGait)	
13.	Análisis estadístico	80
VI.	RESULTADOS	83
	<i>Efectos neurológicos de la inhibición sostenida de GSK-3 mediante abordaje genético</i>	
1.	Diseño del ratón DN-GSK-3	83
2.	Generación de ratones Tet/DN-GSK-3 y mapeo de la expresión del transgén	85
3.	Actividad GSK-3 en ratones Tet/DN-GSK-3	88
4.	Apoptosis neuronal en los ratones Tet/DN-GSK-3	91
5.	Coordinación motora disminuida en ratones Tet/DN-GSK-3	93
6.	Reducción del comportamiento dependiente de dopamina en ratones Tet/DN-GSK-3	96

7. Reversión del déficit motor y la muerte neuronal mediante apagado del transgén	98
<i>Efectos neurológicos de la inhibición crónica de GSK-3 mediante abordaje farmacológico</i>	
8. Paradigma de administración crónica de litio	101
9. Actividad GSK-3 y coordinación motora en ratones tratados crónicamente con litio	102
10. Efecto tóxico del tratamiento crónico de ratones con litio	104
11. Translocación nuclear del factor de transcripción NFAT por litio	106
12. Inmunoreactividad de FasL tras litio crónico	111
13. Muerte neuronal y coordinación motora en ratones deficientes de Fas tratados con litio	113
VII. DISCUSIÓN	117
- Efecto tóxico de la inhibición de GSK-3 mediante expresión transgénica de una forma dominante negativa	119
- La administración de litio reproduce los efectos de la expresión del DN-GSK-3	121
- Potencial terapéutico de los inhibidores de GSK-3 y sus limitaciones	122
- Mecanismo de neurotoxicidad de litio	126
VIII. CONCLUSIONES	129
IX. BIBLIOGRAFÍA	133
X. ANEXO	147

ABREVIATURAS

A β : Amyloid β -peptide / Péptido β Amiloide
ac: comisura anterior
ACH: Acetil cholin / Acetil colina
AIF: Apoptosis Inducing Factor / Factor Inductor de Amiloide
AMP: Adenosine monophosphate / Adenosina monofosfato.
AMPc: cyclic adenosine monophosphate / Adenosina monofosfato cíclica.
AMPA: alpha-amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid / Ácido alfa-amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1/ Factor de Activación de proteasas apoptóticas 1
APC: Adenomatous polyposis coli gene product / Proteína de la poliposis adenomatosa de colon
AP-1: Activator Protein-1 / Proteína activadora 1
APP: Amyloid Precursor Protein / Proteína Precursora de Amiloide
ATP: Adenosine triphosphate / Adenosina trifosfato
 β -cat: β -catenina
BPNasa: bisphosphate nucleotidase / bisfosfato nucleotidasa
BSA: Bovine Serum Albumin / Seroalbúmina Bovina
CA: Cuerno de Ammon
CaMK: Calcium/ Calmodulin-dependent protein Kinase / Proteína Quinasa dependiente de Calcio/ Calmodulina
cc: cuerpo calloso
CDK-5: Cyclin-Dependent Kinase 5 / Quinasa Dependiente de Ciclina 5
CK-I: Casein Kinase I / Caseína Quinasa I
CK-II: Casein Kinase II / Caseína Quinasa II
COS: línea celular de riñón de simio
Cx: Cortex / Corteza
D2: Dopamine receptor type-2/ Receptor de dopamina tipo 2
DA: Dopamine / Dopamina
DG: giro dentado
DISC-1: Disrupted in Schizophrenia 1 / Proteína afectada en Esquizofrenia 1
DISC-1: Death inducing signalling complex / Complejo inductor de muerte
DMSO: Dimethyl sulfoxide / Dimetilsulfóxido
DN: Dominante negativo
DNA: Deoxyribonucleic Acid / Ácido Desoxirribonucleico
DR: Death receptor / Receptor de muerte
DTT: Dithiothreitol / Ditiotreitól
Dvl: Dishevelled
E13.5: Embryonic day 13.5 / Día embrionario E13.5
EA: Enfermedad de Alzheimer
ECL: Enhanced Chemiluminiscent / Sustrato quimioluminiscente
EDTA: Ethylenediaminetetracetic acid / Ácido Etildiaminotetracético
EGTA: Ethylenglycoltetracetic / Ácido Etilenglicoltetracético
EH: Enfermedad de Huntington
eIF2B: eukaryotic initiation factor 2B / Factor de Iniciación Eucariótico 2B
Era: Estrogen receptor α / Receptor de estrógeno α
ERK: Extracellular signal Regulated Kinase / Quinasa regulada por señal extracelular
FAD: Familiar Alzheimer's disease / Enfermedad de Alzheimer familiar
FBPasa: fructose 1,6-bisphosphatase / fructosa 1,6-bisfosfatasa
FBS: Foetal Bovine Serum / Suero Fetal Bovino
FRAT: Frequently Rearranged in Advanced T cell lymphocytes / Frecuentemente Reordenado en linfocitos T avanzados

FST: *Forced swim test* / Prueba de natación forzada
FzI-R: *Frizzled Receptor* / Receptor de Frizzled
GBP: *GSK-3 Binding Protein* / Proteína de unión a GSK-3
GFAP: *Glial Fibrillary Protein* / Proteína Glial Fibrilar
GS-1: *Glycogen Synthase 1* / Glucógeno Sintasa 1
GSK-3: *Glycogen Synthase Kinase 3* / Glucógeno Sintasa Quinasa 3
HEK293: células embrionarias humanas de riñón
HEPES: *N-(2-hydroxyetil)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)* / N-(2-hidroxietil)-piperacina-N'-(2-ácido etanolsulfónico)
Hipp: *Hippocampus* / Hipocampo
htt: Huntingtina
HSF-1: *Heat shock factor-1* / Factor de choque térmico 1
Hsp90: *Heat shock protein 90* / Proteína de choque térmico 90
IC₅₀: *Inhibitory Concentration* / Concentración Inhibitoria
IF: Inmunofluorescencia
IGF-1: *Insuline like grwth factor-1* / Factor de crecimiento similar a insulina-1
IHQ: Inmunohistoquímica
ILK: *Interleukin Linked Kinase* / Quinasa unida a Integrina
IMPasa: *inositol monophosphate phosphatase* / inositol monofosfato fosfatasa
IP₃: *Inositol triphosphate* / Inositol trifosfato
IP₃R: *Inositol triphosphate Receptor* / Receptor de Inositol trifosfato
i.p.: intraperitonealmente
IPPasa: *inositol polyphosphate 1-phosphatase* / inositol polifosfato 1-fosfatasa
IRS: *Insulin receptor substrate* / Sustrato del Receptor de Insulina
KA: *Kainic Acid* / Ácido Kainico
kDa: kilo Dalton
kb: kilobases
LPA: *Lysophosphatidic acid* / Ácido lisofosfatídico
LTD: *Long-Term Depression* / Depresión a largo plazo
LTP: *Long-Term Potentiation* / Potenciación a largo plazo
MAP: *Microtubule Associated Protein* / Proteína Asociada a Microtúbulos
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase* / Proteína Quinasa Activada por Mitógenos
MEK1: *MAP kinase kinase* / MAP quinasa quinasa
mGluR1α: *metabotropic Glutamate Receptor* / Receptor metabotrópico de Glutamato
mM: milimolar
mNOS: *neuronal Nitric Oxide Synthase* / Óxido Nítrico sintasa neuronal
mRNA: *Messenger Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico mensajero
mPFC: corteza prefrontal medial
NES: *Nuclear Export Signal* / Señal de Exportación Nuclear
NFAT: *Nuclear Factor of Activated T cells* / Factor Nuclear de células T Activadas
NF-κB: *Nuclear Factor κB* / Factor nuclear κB
NFT: *Neurofibrillary tangles* / Ovillos neurofibrilares
NGF: *Nerve Growth Factor* / Factor de Crecimiento Nervioso
NMDA: *N-methyl-D-Aspartate* / N-Metil-D-Aspartato
NLS: *Nuclear Localization Signal* / Señal de Localización Nuclear
N-terminal / Amino Terminal
P: *Phosphate* / Fosfato
P10: *Post-natal Day 10* / Día postnatal 10
p90 RSK: p90 Ribosomal S6 Kinase / p90 Quinasa Ribosomal S6
PBS: *Phosphate-Buffered Saline* / Solución Salina de Fosfato Tamponada
PC12: línea celular derivada de feocromocitoma de rata
PCR: *Polymerase Chain Reaction* / Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDH: *Pyruvate dehydrogenase* / Piruvato deshidrogenasa
PDK: *Phosphoinositide-Dependent Kinase* / Quinasa dependiente de fosfoinosítido
PFA: *Paraformaldehyde* / Paraformaldehído
PGM: *phosphoglucomutase* / fosfoglucomutasa
PHF: *Paired helical filaments* / Filamentos pareados helicoidales
PI3K: *Phosphoinositide-3-Kinase* / Fosfoinosítido-3-Quinasa
PIP₂: *Phosphatidylinositol bisphosphate* / Fosfatidil Inositol bifosfato
PIP₃: *Phosphatidylinositol trisphosphate* / Fosfatidil Inositol trifosfato
PKA: *Protein Kinase A* / Proteína Quinasa A
PKB: *Protein Kinase B* / Proteína Quinasa B (también AKT)
PKC: *Protein Kinase C* / Proteína Quinasa C
PLC: *Phospholipase C* / Fosfolipasa C
PMCA: *Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase* / Ca²⁺ ATPasa de la membrana plasmática
PMSF: *Phenylmethylsulphonyl Fluoride* / Fluoruro de Fenilmetilsulfonato
PP1: *Protein Phosphatase 1* / Proteína Fosfatasa 1
PP2A: *Protein Phosphatase 2A* / Proteína Fosfatasa 2A
PS: *Presenilin* / Presenilina
PSD95: *Postsynaptic Density-95 Protein* / Proteína de la Densidad Postsináptica 95
pSer: *Phosphorylated serine* / Serina fosforilada
pTyr: *Phosphorylated tyrosine* / Tirosina fosforilada
PYK2: *Proline-Rich Tyrosine Kinase 2* / Tirosinquinasa 2 Rica en Prolina
Rat-1: línea celular de fibroblastos de ratas
RNA: *Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico
RNAi: *Interference Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico de interferencia
Rsk: *Ribosomal protein S6 Kinase* / Proteína ribosomal S6 quinasa
SDS: *Sodium Dodecyl Sulphate* / Dodecil Sulfato Sódico
SDS-PAGE: *SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* / Gel de Electroforesis de Poliacrilamida con SDS
SH-SY5Y:
siRNA: *Small Interference Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico de interferência pequeño
shRNA: *Small Hairpin Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico en horquilla pequeño
St: estriado
sgg: *Shaggy*
TCF: *T Cell Factor* / Factor de células T
Thal: tálamo
TNF- α : *Tumor necrosis factor- α* / Factor de necrosis tumoral α
TPK1: *Tau protein kinase 1* / Proteína quinasa de tau-1
TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand* / Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
TZDZ: *Thiadiazolidinones* / Tiadiazolidinonas
VPA: *Valproic acid* / Ácido valproico
WB: *Western-Blot*
ZAK1: *Zaphod kinase 1* / Zaphod quinasa 1
ZDF: *Zuker diabetic fatty rat* / Rata diabética obesa Zuker
zw: *zeste white*

RESUMEN / SUMMARY

Se cree que un incremento de actividad GSK-3 contribuye a la etiología de enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, el trastorno bipolar, la esquizofrenia y la diabetes, por tanto apoyando el potencial terapéutico de los inhibidores de GSK-3. Sin embargo, la inhibición sostenida de GSK-3 *in vivo* por medios genéticos (en el ratón mutante nulo constitutivo) reveló una inesperada letalidad embrionaria debida a una apoptosis masiva de las células hepáticas. Por otro lado, el uso del litio (el inhibidor clásico de GSK-3 y el principal tratamiento para el trastorno bipolar), está limitado, normalmente, por sus frecuentes efectos secundarios neurológicos y su devastadora toxicidad por intoxicación.

El objetivo de esta tesis fue estudiar las consecuencias neurológicas de la inhibición de GSK-3 en ratones adultos por abordajes genéticos y farmacológicos y explorar el mecanismo molecular responsable.

Para ello, hemos generado un ratón transgénico con expresión condicional (controlada por tetraciclina) de una forma dominante negativa de GSK-3 en neuronas, como una alternativa genética para predecir las consecuencias derivadas de la inhibición crónica de GSK-3, ya sea *per se* o en combinación con los ratones modelos de enfermedades. Los ratones Tet/DN-GSK-3 mostraron un incremento de apoptosis neuronal y un déficit en coordinación motora.

En vista de la apoptosis neuronal presentada por el ratón Tet/DN-GSK-3, planteamos la hipótesis de que los niveles terapéuticos del litio podrían inducir también pérdida neuronal por la inhibición de GSK-3. Nuestros resultados demuestran que la administración crónica de litio en ratones causa apoptosis neuronal en varias regiones cerebrales que correlacionan con alteraciones motoras. También describimos un mecanismo por el cual la inhibición de GSK-3 aumenta la translocación de los factores de transcripción NFATc3/c4, lo cual lleva a un aumento de la expresión de FasL y a la activación del receptor de Fas. Además, la señalización mediada por Fas demuestra estar mediando tanto la apoptosis inducida por litio como los déficits motores, como se demuestra por su ausencia en los ratones *lpr*, deficientes en Fas.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de una actividad GSK-3 intacta para la viabilidad y la fisiología de neuronas, y advierten de una potencial toxicidad neurológica inducida por una inhibición farmacológica de GSK-3 por debajo de sus niveles fisiológicos. Curiosamente, los datos de reversibilidad sugieren que los efectos adversos son susceptibles de revertir si se interrumpe la inhibición excesiva de GSK-3. Estos resultados podrían también posibilitar el desarrollo de nuevos tratamientos combinados, no solo para contrarrestar los efectos adversos de la terapia con litio en el

tratamiento del trastorno bipolar, sino también para la extensión del potencial terapéutico del litio y de otros inhibidores de GSK-3 en desarrollo, a la enfermedad de Alzheimer y a otras enfermedades.

Increased GSK-3 activity is believed to contribute to the etiology of chronic disorders like Alzheimer's disease, bipolar disorder, schizophrenia and diabetes, thus supporting therapeutic potential of GSK-3 inhibitors. However, *in vivo* sustained inhibition by genetic means (constitutive knock-out mice) revealed unexpected embryonic lethality due to massive hepatocyte-apoptosis. Besides, use of the classical GSK-3 inhibitor, lithium, (the mainstay for treatment and prophylaxis of bipolar disorder) is usually limited by its frequent neurological side-effects and its devastating overdose-induced toxicity.

The aim of this thesis was to study the neurological consequences of sustained GSK-3 inhibition in adult mice by genetic and pharmacological approaches and to explore the underlying molecular mechanism.

Here we generate transgenic mice with conditional (tetracycline-system) expression of dominant-negative-GSK-3 in neurons as an alternative genetic approach to predict the outcome of chronic GSK-3 inhibition, either *per se*, or in combination with mouse-models of disease. Tet/DN-GSK-3 mice showed increased neuronal apoptosis and impaired motor coordination. Interestingly, DN-GSK-3 expression shut-down restored normal GSK-3 activity and re-established normal incidence of apoptosis and motor coordination.

In view of the neuronal apoptosis phenotype of Tet/DN-GSK-3 mice, we hypothesized that therapeutic lithium levels could also induce neuronal loss through GSK-3 inhibition. Here we report that chronic lithium administration in mice indeed causes neuronal apoptosis in various brain regions thus leading to motor-deficits. We describe a mechanism by which GSK-3 inhibition increases nuclear translocation of NFATc3/4 transcription factors leading to increased FasL expression and Fas-receptor activation. Furthermore, Fas-mediated signaling is demonstrated to mediate both lithium-induced apoptosis and motor-deficits as evidenced by their absence in Fas-deficient *lpr* mice.

These results reveal the importance of intact GSK-3 activity for adult neuron viability and physiology and warn of potential neurological toxicity of GSK-3 pharmacological inhibition beyond physiological levels. Interestingly, the reversibility data also suggest that unwanted side-effects are likely to revert if excessive GSK-3 inhibition is halted. These findings also may enable development of new co-adjuvant treatments not only to counteract the drawbacks of lithium therapy for mood disorders but also to extend the potential of lithium, and other GSK-3 inhibitors, to Alzheimer's and other diseases.

INTRODUCCIÓN

1. GLUCÓGENO SINTASA QUINASA-3

1.1 DESCUBRIMIENTO DE GSK-3

La glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) fue identificada inicialmente como una proteína que fosforila e inhibe a la glucógeno sintasa de manera independiente de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (Cohen et al., 1978). Fue aislada por primera vez de músculo esquelético de conejo (Embi et al., 1980) y resultó ser altamente específica para la glucógeno sintasa (GS), fosforilándola en tres sitios (Rylatt et al., 1980). El análisis de los sitios de fosforilación en GS reveló que se trataba de una proteína distinta de la proteína quinasa A (PKA) y de la fosforilasa quinasa, que eran las dos enzimas con actividad glucógeno sintasa quinasa caracterizadas hasta ese momento. Por ésto se nombró como glucógeno sintasa quinasa-3. Posteriormente se descubrió que GSK-3 era idéntica al factor A, activador de la fosfatasa PP-1 (Hemmings et al., 1982) y a TPKI, tau proteína quinasa I (Ishiguro et al., 1993).

El clonaje de GSK-3 en 1990, reveló dos isoformas en mamíferos: GSK-3 α , de 51 kDa y GSK-3 β , de 47 kDa, que están codificadas por genes distintos (Woodgett, 1990). Posteriormente se identificó una variante de *splicing* de la forma β (Mukai et al., 2002). La isoforma GSK-3 β está expresada en todo el reino animal, mientras que GSK-3 α se encuentra sólo en vertebrados (Plyte et al., 1992). La secuencia de aminoácidos de los dominios catalíticos de ambas presenta un grado de homología del 98%. Las regiones con menor homología en la secuencia corresponden al extremo C-terminal, con tan sólo un 36%, y el extremo N-terminal, en el que sólo la isoforma α posee una cola de aminoácidos rica en glicinas (Woodgett, 1990).

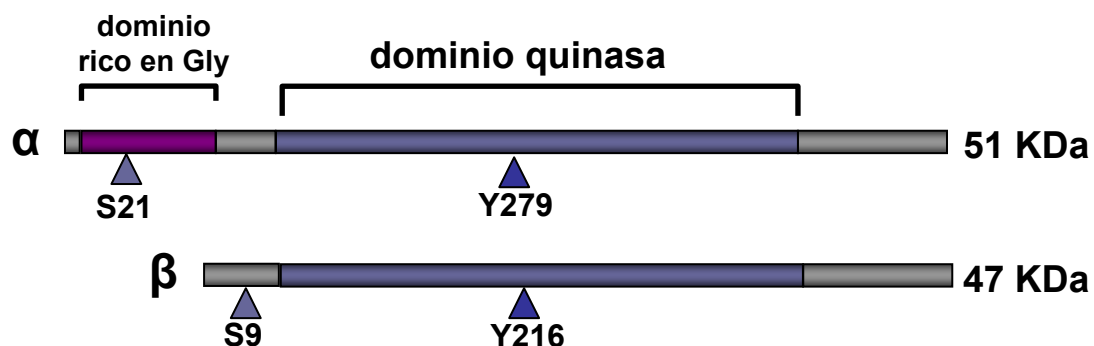


Figura 1. Esquema de las dos isoformas, GSK-3 α y GSK-3 β , de mamíferos.

Las funciones de estas dos isoformas parecen ser distintas. Un estudio en *Drosophila melanogaster* demostró que GSK-3 β podía sustituir a su homólogo *shaggy*, lo cual no ocurría con GSK-3 α (Ruel et al., 1993). Además, el mutante nulo (knock-out) de GSK-3 β es viable sólo hasta el día embrionario E13.5, lo que sugiere que, hasta ese momento, las funciones de GSK-3 α y β son equivalentes, pero no después (Hoeftlich et al., 2000). Recientemente, se ha generado un mutante nulo condicional para GSK-3 α (MacAulay et al., 2007) que, a diferencia del mutante nulo de la isoforma β , es viable. Las diferencias entre los ratones mutantes nulos de ambas isoformas, que se abordarán en detalle más adelante, ponen de manifiesto funciones fisiológicas específicas para ambas proteínas.

GSK-3 es una enzima que, a pesar de ser ubicua, es mayoritaria en cerebro (Woodgett, 1990; Takahashi et al., 1994). El nivel de expresión de la isoforma GSK-3 β alcanza un nivel máximo entre el día embrionario E18 y el día post-natal P10, intervalo que coincide con el periodo de mayor extensión dendrítica y sinaptogénesis. A partir de entonces, los niveles disminuyen durante las cinco semanas siguientes, manteniéndose después en el adulto (Takahashi et al., 1994; Leroy and Brion, 1999). En el caso de GSK-3 α , los mayores niveles se producen durante las tres primeras semanas del periodo post-natal (Takahashi et al., 1994). Respecto a la distribución celular, GSK-3 β se localiza en el soma y en la parte proximal de las dendritas durante el desarrollo y en cerebro adulto, pero sólo se puede encontrar en el tracto axonal en el periodo embrionario (Leroy and Brion, 1999).

1.2 REGULACIÓN DE GSK-3

Antes de describir las modificaciones e interacciones de GSK-3 que regulan su actividad, cabe citar que un nivel de regulación previo radica en el estado de pefosforilación de alguno de sus sustratos. Para ello, estos sustratos necesitan ser fosforilados previamente por una enzima distinta, por ejemplo, en el caso de la GS, sería la caseína quinasa II (CKII). El motivo consenso es Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr(P), en el que el residuo fosforilado constituye un sitio indispensable para el reconocimiento por GSK-3 (rev. en Grimes and Jope, 2001; Frame and Cohen, 2001).

La determinación, en 2001, de la estructura cristalina, ha ayudado a explicar la necesidad de esta pefosforilación. Según estos datos, se postula que el residuo pefosforilado se une a un bolsillo cargado positivamente formado por los residuos R96, R180 y K205 en GSK-3 β y sus correspondientes en la isoforma GSK-3 α . La unión a esta

zona de carga positiva, optimiza la orientación del dominio quinasa y, a su vez, se sitúa el sustrato en la posición correcta para su fosforilación (rev. en (Doble and Woodgett, 2003).

En cuanto a la regulación de GSK-3 propiamente dicha, hay varias formas descritas: inactivación por fosforilación en serina, posible activación por fosforilación en tirosina y formación de complejos con otras proteínas (rev. en Frame and Cohen, 2001; Grimes and Jope, 2001).

1.2.1 Inactivación por fosforilación en serina

La fosforilación en el extremo N terminal, concretamente en las serinas 21 ó 9 de GSK-3 α ó GSK-3 β respectivamente, hace que la proteína quede en un estado inactivo. Cuando GSK-3 se fosforila en Ser 21/9, este fosfato se une al bolsillo cargado positivamente de forma equivalente al residuo pefosforilado. El extremo N-terminal crea entonces un pseudo-sustrato que ocupa el dominio catalítico, impidiéndose así la unión de sustratos “reales” de la proteína (rev. en Doble and Woodgett, 2003).

La serina 21/9 y la secuencia circundante sólo están conservadas en mamíferos, *Xenopus laevis* y *Drosophila melanogaster*, sugiriendo para levaduras, plantas superiores, *Dyctiostelium discoideum* y *Caenorhabditis elegans* otras formas de inactivación (Frame and Cohen, 2001).

Esta fosforilación se atribuye a la acción de quinasas como p70S6k, p90Rsk, Akt (también llamada PKB), MAPKAP-K1 y algunas isoformas de PKC y PKA, algunas de éstas implicadas en las rutas de señalización por insulina-IGF1, mTOR o MAPK (rev. en Grimes and Jope, 2001).

Existe una forma de autorregulación de GSK-3 a través de la fosforilación en Ser 21/9. Ésta consiste en una amplificación de la inhibición de GSK-3 mediada por PP-1. Este mecanismo comenzaría con una disminución de actividad de GSK-3, que produciría una menor activación de la proteína fosfatasa 1 (PP-1) y esta disminución de actividad produciría, a su vez, un desplazamiento del equilibrio hacia la forma fosforilada en serina de GSK-3 (Zhang, 2003).

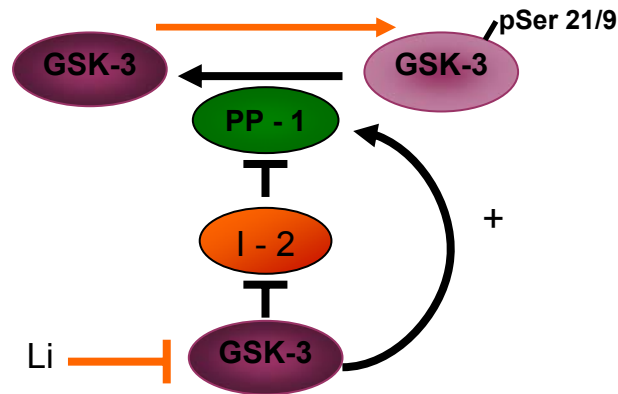


Figura 2. **Mecanismo de amplificación de la inhibición de GSK-3.** En condiciones normales de actividad GSK-3, ésta inhibe a la subunidad reguladora de PP-1, la I-2, impidiendo su función inhibitoria y por tanto activando PP-1. En condiciones de menor actividad de GSK-3, I-2 ejerce su acción reguladora, disminuyendo la actividad de PP-1, lo cual favorece la fosforilación de serina de GSK-3.

1.2.2 Fosforilación en tirosina

La proteína GSK-3 puede ser fosforilada en las tirosinas 279 ó 216 de GSK-3 α ó GSK-3 β , respectivamente. Parece ser que este residuo juega un papel importante en forzar y favorecer la apertura del sitio de unión al sustrato. Esta fosforilación en tirosina no resulta imprescindible para su actividad, ya que la forma defosforilada no presenta restricciones a la apertura del sitio de unión del sustrato (Hughes et al., 1993; Doble and Woodgett, 2003).

Las proteínas responsables de esta fosforilación no están aún muy claras. Algunos estudios postulan que puede ser fosforilada por ZAK1 en *Dictyostelium* o por Fyn y PIK2 *in vitro* (Grimes and Jope, 2001), así como por acción combinada de otras tirosina quinasas, la propia GSK-3 y fosfatasas que regulan la acumulación de pTyr279/216- GSK-3 α/β (Simón et al., 2008).

Algunos estudios demuestran que GSK-3 puede autofosforilarse en este residuo (Wang et al., 1994; Cole et al., 2004; Lochhead et al., 2006), aunque otros han encontrado resultados opuestos (Hughes et al., 1993; Bhat et al., 2000). Lochhead y cols, describen un estado intermedio susceptible de autofosforilación dependiente de la chaperona hsp90. Este estado intermedio ocurriría durante el plegamiento, siendo uno de los eventos tardíos en la maduración de GSK-3 (Lochhead et al., 2006).

1.2.3 Formación de complejos

El ejemplo más conocido de la modulación por formación de complejos proteicos está mediado por proteínas de la ruta de Wnt. El complejo formado por GSK-3 con las proteínas Dvl (Dishevelled) y GBP (GSK-3 binding protein), familia que incluye a las proteínas Frat 1 y Frat 2, y llevaría a la inactivación de GSK-3, fundamentalmente por impedimento estérico (rev. en Grimes and Jope, 2001). En células HEK293, cuando GSK-3 se encuentra formando este complejo, no puede ser fosforilada en serina por acción de la insulina, posiblemente porque no se encuentre accesible el extremo N terminal (Ruel et al., 1999). En cambio, cuando el complejo se forma entre GSK-3 y las proteínas Axin, APC (adenomatus polyposis coli gene product) y β -catenina, GSK-3 se encuentra activa fosforilando a las otras tres proteínas y, de esta forma, regulando la degradación de β -catenina (rev. en Grimes and Jope, 2001). Vease esquema de la ruta de Wnt (pag. 39).

GSK-3 también forma complejo con presenilina-1 (PS-1), una proteína implicada en al procesamiento del péptido β -amiloide ($A\beta$). Estudios de Takashima y cols. identificaron el complejo que forma PS-1 con GSK-3 y tau, lo que sugiere un papel importante de PS-1 en mantener la proximidad de estas dos proteínas y, por tanto, favoreciendo la actuación de GSK-3 sobre tau (Takashima et al., 1998).

Además existen dos complejos de GSK-3 que están regulados por estradiol. En el primero de ellos participarían GSK-3, β -catenina y el receptor de estradiol ($ER\alpha$). Sobre este complejo, el estradiol afectaría aumentando la fosforilación en serina de GSK-3 y favoreciendo la liberación de β -catenina del complejo. En el segundo, además de GSK-3 y β -catenina, estarían implicados tau y la subunidad reguladora de la PI3K, p85. Aquí el estradiol aumentaría la proporción de tau defosforilada y la fosforilación en serina de GSK-3 (Cardona-Gomez et al., 2004).

1.3. RUTAS EN LAS QUE PARTICIPA GSK-3

El papel de GSK-3 está muy bien establecido, entre otras rutas de señalización, en dos rutas que son fundamentales en muchos procesos, la ruta de Wnt y la de insulina-IGF-1.

1.3.1 *Papel de GSK-3 en la ruta de Wnt*

GSK-3 β participa en la ruta de Wnt que está conservada desde *Dyctiostelium* hasta vertebrados (Dale, 1998). En invertebrados como *Drosophila* se conoce como la ruta de *wingless*. La ruta de Wnt es determinante en desarrollo embrionario, aunque también está activa en adultos (McMahon and Bradley, 1990; Patapoutian and Reichardt, 2000). En ausencia del ligando extracelular Wnt, GSK-3 forma complejo con Axina y APC. En dicho complejo, GSK-3 fosforila a β -catenina marcándola para su ubiquitinación y degradación por el proteasoma. En cambio, en presencia de Wnt, GSK-3 es secuestrada por Dvl y Frat 1, quedando libre β -catenina. Así, los niveles en citoplasma de β -catenina aumentan, este se transloca al núcleo y se une a factores de transcripción de la familia TCF/LEF (Behrens et al., 1998; Dale, 1998). De esta forma se activa la transcripción de diversos genes, muchos de ellos con importantes papeles durante el desarrollo.

Aunque en la ruta de Wnt se ha estudiado especialmente el papel de GSK-3 β , pues es la única presente en *Drosophila*, los niveles de β -catenina nuclear están también regulados por la isoforma α de GSK-3 (Asuni et al., 2006). De hecho, se ha demostrado que en ratones con menos actividad GSK-3 β no hay acumulación de β -catenina, puesto que GSK-3 β es simplemente reemplazado por GSK-3 α (Doble and Woodgett, 2003). En tejido de ratón adulto, se ha descrito que la localización nuclear de β -catenina se da principalmente en el tálamo, coincidiendo con una menor expresión de GSK-3 β en esta región (Lucas et al., 1999).

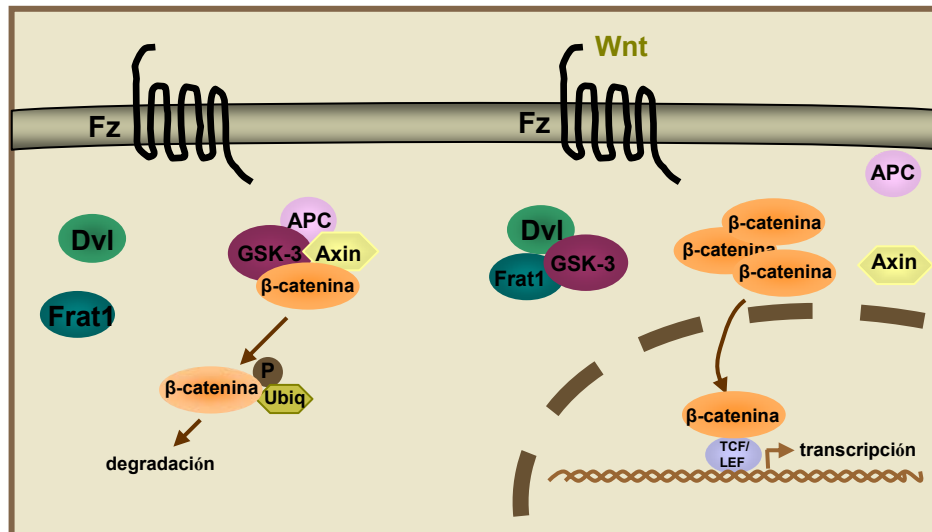


Figura 3. **Ruta de señalización de Wnt.** En ausencia del ligando Wnt, GSK-3 secuestra a β -catenina, fosforilándola y marcándola para su degradación por el proteasoma. En presencia de Wnt, GSK-3 forma otro complejo, dejando libre a β -catenina para translocarse al núcleo y activar la transcripción de TCF/LEF.

1.3.2 Papel de GSK-3 en la ruta de señalización por insulina / IGF-I

Inicialmente se descubrió que la insulina estimula la defosforilación de la glucógeno sintasa en los sitios donde es fosforilada por GSK-3, activando así el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno (Parker et al., 1983). Más concretamente, se ha descrito que la inhibición de GSK-3 por insulina ocurre mediante la fosforilación de un residuo de serina en el extremo N-terminal de la proteína (Ser²¹ en GSK-3 α y Ser⁹ en GSK-3 β). Esta fosforilación es catalizada por la proteína Akt, que es activada, a su vez, por insulina a través de la fosforilación por PI3K (Welsh et al., 1998; Welsh and Proud, 1993).

En 1997, Eldar-Finkelman y cols. descubrieron que el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) era fosforilado e inhibido por GSK-3, de modo que se evitaba la fosforilación en tirosina de p85, subunidad reguladora de PI3K. Ésto antagonizaba los efectos de la ruta de insulina (Eldar-Finkelman and Krebs, 1997). Éste sería un posible mecanismo de resistencia a insulina en diabetes tipo 2.

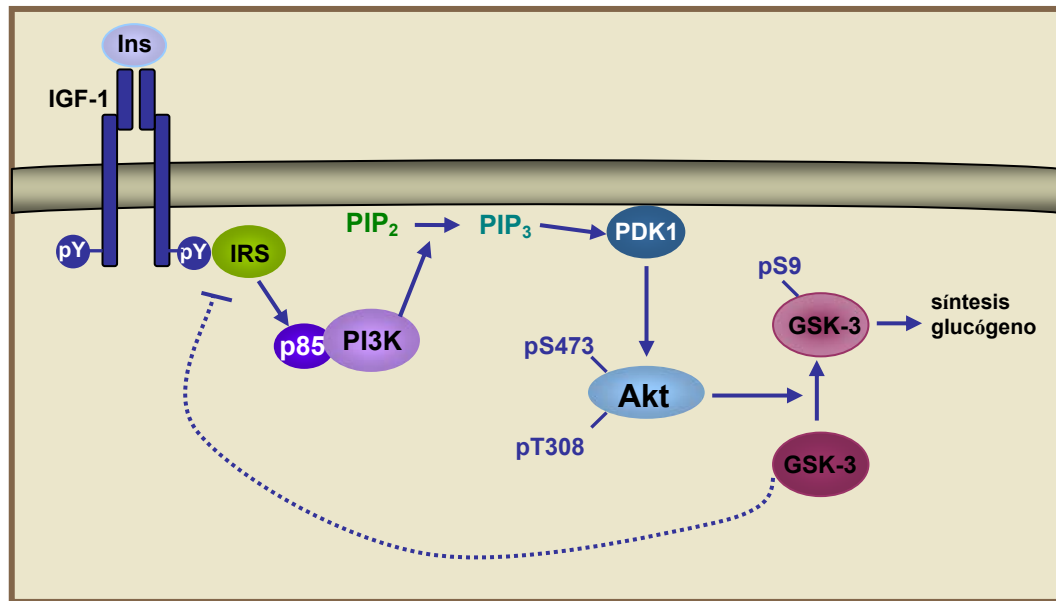


Figura 4. **Ruta de señalización de insulina-IGF-1.** La insulina inicia una cascada de señalización que resulta en activación de Akt y fosforilación e inactivación de GSK-3.

1.4. FUNCIONES EN LAS QUE ESTÁ IMPLICADA GSK-3

Por participar en las rutas de Wnt e insulina entre otras, la actividad GSK-3 está implicada en muchas funciones. Mencionaremos brevemente, a continuación, algunas de ellas y desarrollaremos en detalle sólo su papel en la regulación de la muerte celular por apoptosis.

1.4.1 Decisión del destino celular en desarrollo embrionario temprano

La proteína GSK-3 β juega un papel importante durante el desarrollo. En *Drosophila*, la proteína homóloga de GSK-3 β , llamada *shaggy* o *zeste-white 3* (*sgg/zw3*), está implicada en la determinación del destino celular (Ruel et al., 1993). En experimentos con mutantes deficientes en *shaggy*, ésta puede ser sustituida por GSK-3 β , no así por GSK-3 α . Profundizando, GSK-3 β puede reemplazar a *shaggy* en la fase de decisión celular entre neural-epidermal, pero no es tan efectiva durante otras fases del ciclo vital en que también interviene *shaggy*. Experimentos con formas mutadas inactivas de GSK-3 en *Xenopus* han demostrado que GSK-3, por ser un componente de la ruta Wnt, determina la formación del eje dorsoventral, regulando el establecimiento de la polaridad durante el desarrollo (Dominguez et al., 1995; He et al., 1995). En

estudios en cerebro de rata se ha localizado GSK-3 β en neuronas en todos los estadios del desarrollo (Leroy and Brion, 1999).

1.4.2. Regulación metabólica

Entre las proteínas que se han establecido como sustratos de GSK-3, se encuentran numerosas enzimas metabólicas. GSK-3 es una enzima clave en el metabolismo de glúcidos, una de sus implicaciones metabólicas más estudiadas. Como se ha mencionado anteriormente, GSK-3 es una proteína quinasa que fosforila e inhibe a la glucógeno sintasa, enzima que cataliza el último paso de la síntesis de glucógeno (Embi et al., 1980). También en el metabolismo de glúcidos, GSK-3 fosforila e inhibe a la piruvato deshidrogenasa, enzima importante en la obtención de energía y en la síntesis de acetilcolina, acciones que pueden contribuir a la patología de la enfermedad de Alzheimer (rev. en Grimes and Jope, 2001). Respecto a la síntesis de proteínas, GSK-3 regula la expresión de eIF2B (eukaryotic protein synthesis initiation factor 2B), factor esencial en la iniciación de la traducción (rev. en Cohen et al., 1997).

Proteínas metabólicas y de señalización	Proteínas estructurales	Factores de transcripción
Acetil-CoA carboxilasa	DF3/MUC	AP-1 (fam Jun)
APP	Kinesina (LC)	β -catenina
APC	KRP	C/EBP
ATP-citrato liasa	MAP1B	CREB
Axina	MAP2	GATA4
Ciclina D1	NCAM	Receptor glucocorticoide
Ciclina E	Neurofilamentos	HIF-1
Cubitus interruptus	Nineina	HSF-1
eIF2B		Mash-1
GS		MITF
hnRNP		c-Myb
I-2		c-Myc
IRS-1		NeuroD
Nucleoporina p62		NFAT
P21		NF- κ B (p65 y p105)
PKA		Notch
PP-1		p53
Proteína básica de mielina		
PS-1		
PDH		
Receptor NGF		

Tabla 1. Sustratos de GSK-3.

1.4.3. Estructura del citoesqueleto

Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) son componentes estabilizadores del citoesqueleto. De estas proteínas, al menos tres son fosforiladas por GSK-3, como son tau, MAP1B y MAP2.

La proteína **tau** es fosforilada por GSK-3 en residuos que se han visto fosforilados en los filamentos pareados helicoidales (PHFs). En ensayos realizados con proteínas recombinantes *in vitro* se ha encontrado tau fosforilado en 10 residuos (Hanger et al., 1998) y en 8 residuos en ensayos realizados en células COS (Lovestone et al., 1994). Parece ser que tau regula la morfología neuronal. En cerebros adultos normales, tau se encuentra fosforilada parcialmente y contiene secuencias de unión a tubulina. Esta unión a tubulina favorece la nucleación y estabilización de los microtúbulos, suprimiendo su dinámica (rev. en Avila et al., 2004). En cambio, en presencia de elevados niveles de GSK-3, tau se encuentra mayoritariamente difuso en el citoplasma y en muy poca proporción unido a microtúbulos. Esta situación, además, se revierte con litio, el inhibidor clásico de GSK-3 (Lovestone et al., 1999; Lovestone et al., 1996; Munoz-Montano et al., 1997; Xie et al., 1998). En 1997, Muñoz-Montano y cols. vieron, tanto en cultivos de neuronas de cerebelo, como *in vivo*, en ratas, que el litio disminuía la fosforilación de tau específicamente en los sitios fosforilados por GSK-3 (Munoz-Montano et al., 1997).

En estudios posteriores del mismo grupo, describieron además, un papel modulador de GSK-3 en el crecimiento de las neuritas. La inhibición parcial por litio en cultivos de neuronas de cerebelo aumentaba la extensión de las neuritas, mientras que, curiosamente, el bloqueo total de la actividad GSK-3 disminuía la longitud de éstas. Esto pone de manifiesto la necesidad de un nivel mínimo de actividad GSK-3 para el crecimiento óptimo de las neuritas (Munoz-Montano et al., 1999). Por otro lado, en células SH-SY5Y, la inhibición de PI3K producía retracción de las neuritas en células ya diferenciadas. Además, se vio que también estaba implicada en el mantenimiento del fenotipo neuronal. Así, la retracción de neuritas por wortmanina, inhibidor de la ruta PI3K, aumentaba la fosforilación de tau y MAP1B, revelando una implicación de GSK-3 en este proceso de retracción (Sanchez et al., 2001).

En situaciones patológicas se da una hiperfosforilación aberrante de tau, que bloquea la unión a microtúbulos y, en consecuencia, tau se encuentra libre, favoreciéndose su agregación en forma de PHFs y posteriormente de ovillos neurofibrilares (NFTs) (Hanger et al., 1992).

La unión de **MAP1B** a microtúbulos contribuye a la estabilidad de éstos y, por tanto, a la estructura de las neuronas (Goold and Gordon-Weeks, 2001). Cuando MAP1B es fosforilada por GSK-3 previene la conversión de microtúbulos inestables a estables y, por tanto, favorece el estado inestable y dinámico requerido en la migración (Goold and Gordon-Weeks, 2001).

Se ha visto que MAP1B se concentra en regiones del sistema nervioso central (SNC) adulto que muestran plasticidad neuronal o regeneración tras daño, como el cono de crecimiento y las neuritas, particularmente en proyecciones largas, sugiriendo que se requiere MAP1B en procesos de elongación y no de iniciación, lo cual puede ocurrir en una fase tardía del crecimiento (Goold and Gordon-Weeks, 2001; Goold et al., 1999).

Respecto a la proteína **MAP2**, en concreto MAP2C, se sabe que es fosforilada en dos residuos por GSK-3. Estudios de cotransfección con MAP2C y GSK-3 en células COS establecieron un papel importante de la fosforilación en la prevención de la formación de haces de microtúbulos, que se observan cuando se transfectaba solamente con MAP2C (Sanchez et al., 2000). Esto sugiere que GSK-3 puede modificar la unión a microtúbulos de MAP2, teniendo como fin el regular la estabilidad de éstos.

1.4.4. Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que transcurre con condensación del núcleo, fragmentación del ADN y, finalmente, disgregación de la célula en pequeños cuerpos apoptóticos que están destinados a ser fagocitados (Assuncao Guimaraes and Linden, 2004). Se han establecido dos papeles opuestos para GSK-3 en la apoptosis celular: en determinadas condiciones actúa como agente facilitador de la apoptosis y en otras condiciones ejerce una acción anti-apoptótica (rev. en (Beurel and Jope, 2006). Lo que determina que GSK-3 actúe en un sentido o en otro es el tipo de apoptosis que se produzca, que puede ser intrínseca (tipo I) o extrínseca (tipo II). Es importante llegar a comprender esta dualidad, puesto que, entre las enfermedades en las que está implicada GSK-3, unas se caracterizan por una mayor muerte celular (enfermedades neurodegenerativas), mientras que en otras se da una apoptosis deficiente (cáncer o enfermedades autoinmunes).

a) La **apoptosis intrínseca** implica la pérdida de integridad de la mitocondria y cursa con liberación de citocromo c. En el citoplasma, el citocromo c liberado se une a APAF, ATP y procaspasa 9, formándose así el apoptosoma y dando lugar a la activación de caspasas y, como consecuencia final, a la destrucción de la célula. GSK-3 participa en la ruta intrínseca de apoptosis mediante la actuación sobre dianas, como Bax (Linseman et al., 2004), Bim (Hongisto et al., 2003) o VDAC (Pastorino et al., 2002), que contribuyen a la desintegración de la mitocondria (rev. en (Beurel and Jope, 2006).

Los estímulos que pueden desencadenar este tipo de muerte celular son diversos, entre otros, daño en el ADN, estrés oxidativo o estrés de retículo endoplásmico. Existen numerosas evidencias que han demostrado que, en condiciones de activación de la ruta intrínseca, GSK-3 ejerce un papel pro-apoptótico. Inicialmente se encontró que GSK-3 estaba implicado en la apoptosis en respuesta a la inhibición de la ruta PI3K (Pap and Cooper, 1998). Más tarde, se vio que, en cultivos de neuronas corticales de rata, además de la apoptosis producida por inhibición de la ruta PI3K, GSK-3 participaba en la apoptosis en respuesta a una retirada de factores tróficos (Hetman et al., 2000; Hetman et al., 2002). Es más, como consecuencia a la retirada de factores tróficos en células PC12, GSK-3 β aumenta su fosforilación en Tyr 216, pudiéndose revertir mediante litio o insulina, lo cual afecta a la fosforilación en Ser 9 y pero no en Tyr 216 (Bhat et al., 2000). En respuesta a thapsigargina, inductor de estrés de retículo, no solo se activa caspasa-3, sino que aumenta notablemente la actividad de GSK-3 (Song et al., 2002). Un hecho interesante fue descrito en células Rat-1 y PC-12 donde, en ausencia de estímulos apoptóticos, la sobreexpresión de GSK-3 producía muerte celular por sí misma, pudiéndose revertir la apoptosis con la expresión de la forma dominante negativa de GSK-3 (K85R-GSK-3) (Pap and Cooper, 1998). En la mayoría de estos estudios la inducción de apoptosis puede ser revertida por litio u otros inhibidores de GSK-3, estableciéndose un papel neuroprotector de estos inhibidores, con posible aplicación terapéutica.

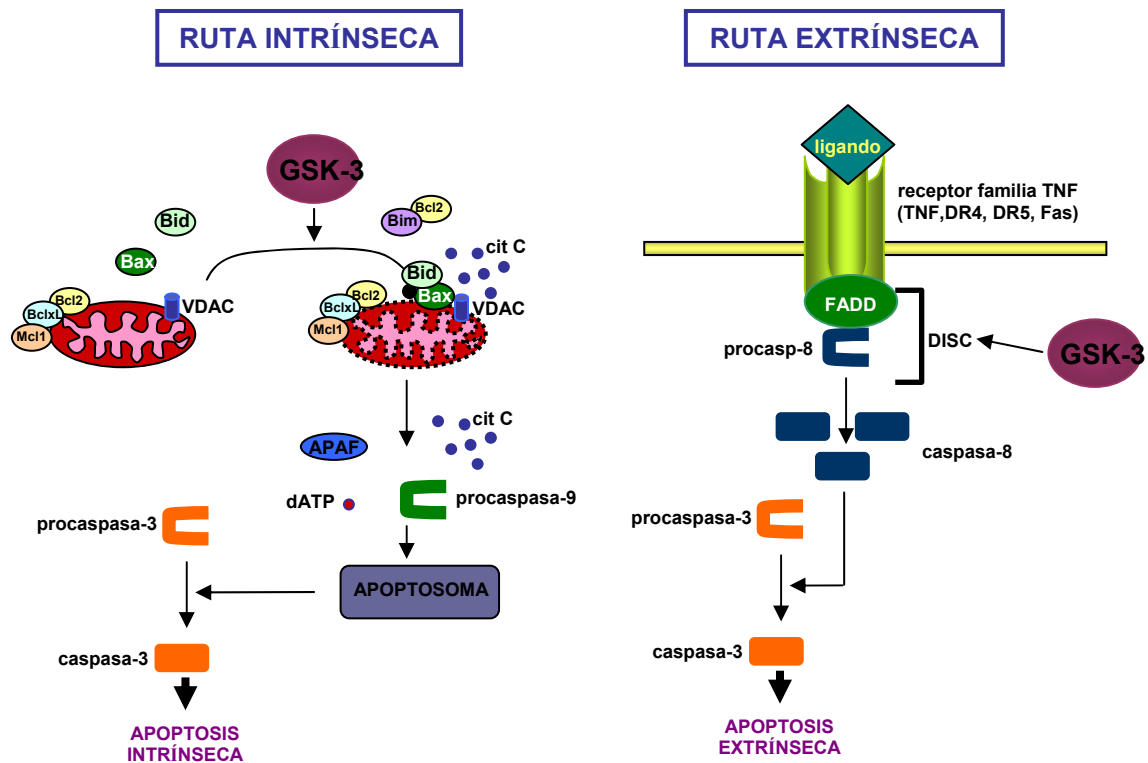


Figura 5. **Esquemas de las rutas de apoptosis intrínseca (izquierda) y extrínseca (derecha).** En la ruta intrínseca, GSK-3 ejerce una acción pro-apoptótica, actuando sobre dianas como Bax, Bim y VDAC, contribuyendo a la desintegración de la mitocondria y liberación del citocromo c. En la ruta extrínseca, el papel de GSK-3 es anti-apoptótico, impidiendo la formación del complejo DISC.

b) La **apoptosis extrínseca** implica la activación de receptores de muerte de la familia del receptor TNF situados en la membrana plasmática, tales como TNF-R, Fas (también llamado CD95), DR4 y DR5 (Ashkenazi, 1998). Aunque cada uno de estos receptores es activado por su propio ligando, comparten un mecanismo común. La estimulación por ligando produce la trimerización del receptor al que se unen la proteína FADD (Fas-associated death domain) y la procaspasa-8. Así se forma el complejo de señalización inductor de muerte (DISC, death domain inducing complex). (Peter and Krammer, 2003). Seguidamente se da la autoactivación de caspasa-8, lo cual lleva a la activación de caspasas efectoras y a la terminación de la apoptosis (rev. en (Beurel and Jope, 2006).

El papel de GSK-3 como agente anti-apoptótico en ejemplos de la ruta extrínseca ha sido menos estudiado. La mayoría de estos estudios se realizó en modelos celulares de células tumorales, donde se postula que inhibir GSK-3 mejora la resistencia a la quimioterapia. Las primeras evidencias datan de 1989, cuando Beyaert y colaboradores, descubrieron, en células tumorales murinas y humanas, que el LiCl potenciaba la

toxicidad por TNF *in vitro*, de un modo similar a la cicloheximida, la actinomicina D o el interferón γ (Beyaert et al., 1989). Como consecuencia, se proponía un tratamiento combinado de ambos para mejorar la respuesta a quimioterapia en pacientes de cáncer.

Posteriormente, se generó el ratón mutante nulo de GSK-3, que resultó no ser viable a partir del día embrionario E13.5-14.5, como consecuencia de una apoptosis masiva de las células hepáticas por hipersensibilidad a TNF α (Hoefflich et al., 2000). Este estudio, utilizando fibroblastos (MEF) derivados del ratón mutante nulo y sus controles, relacionó a GSK-3 con la activación de la proteína NF κ B, relacionada con supervivencia celular, señalando su acción reguladora a nivel del complejo transcripcional.

Otros estudios demuestran la potenciación, por inhibidores de GSK-3, de la muerte activada por vía extrínseca en líneas celulares tumorales (Liao et al., 2003; Ougolkov et al., 2007). Un reciente estudio, realizado también en líneas celulares tumorales, profundiza en este mecanismo y sitúa a GSK-3 formando complejo con el receptor de muerte, impidiendo así la formación del DISC (death-inducing signaling complex). Al activarse el receptor de muerte, induciría cambios en el complejo e inhibiría GSK-3, favoreciéndose la apoptosis (Sun et al., 2008). En 2004, en el grupo de R.S. Jope, se realizó el primer estudio de GSK-3 como componente de la vía extrínseca en células neuronales. Este estudio puso en evidencia que la apoptosis por activación de la vía extrínseca, en concreto por el receptor de Fas, estaba favorecida por litio y otros inhibidores de GSK-3.

2. GSK-3 COMO POSIBLE DIANA TERAPÉUTICA EN PATOLOGÍAS HUMANAS.

2.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad propia de edades avanzadas cuyos síntomas clínicos son desorientación, pérdida de memoria, déficit perceptivo, afasia, apraxia, agnosia y conductas anómalas (Cummings, 2004). La mayoría de los casos pertenecen a la forma esporádica y menos del 5% pertenecen a la forma familiar. La forma familiar de la enfermedad de Alzheimer (FAD) puede estar causada por mutaciones en los genes de presenilina-1 (PS-1), de presenilina-2 (PS-2) o de la proteína precursora del amiloide (APP) (Hardy, 2006).

Las marcas histopatológicas, descritas por primera vez por Alois Alzheimer en 1906, son la presencia de placas neuríticas y de ovillos neurofibrilares. Todo ello ocurriría en paralelo con una pérdida importante de neuronas en la corteza cerebral (Alzheimer, 1907; Alzheimer et al., 1995). Las placas neuríticas o seniles están compuestas, mayoritariamente, por agregados del péptido β -amiloide (Masters et al., 1985). Éstos se encuentran en el medio extracelular y están frecuentemente rodeados de neuritas distróficas. Los ovillos neurofibrilares son agregados de filamentos pareados helicoidales (PHF) que, a su vez, están compuestos de la proteína tau aberrantemente fosforilada (Goedert et al., 1998). Estos ovillos neurofibrilares son normalmente intraneuronales, aunque se pueden encontrar fuera de las neuronas, posiblemente como resultado de la lisis de la membrana durante la muerte celular. El declive cognitivo en la EA viene acompañado por pérdida neuronal y atrofia, principalmente en corteza, hipocampo y amígdala (Gomez-Isla et al., 1997).

Teniendo en cuenta las evidencias que existen, se ha aceptado que la causa primaria de la enfermedad de Alzheimer es la acumulación cerebral del péptido $A\beta$ y que el resto de procesos son consecuencia de esto (Hardy and Selkoe, 2002).

Existen evidencias indirectas de una mayor actividad de GSK-3 en pacientes de EA (rev. en Hooper et al., 2008; Blalock et al., 2004; Hye et al., 2005; Imahori and Uchida, 1997; Pei et al., 1997; Leroy et al., 2007). Más allá de estas evidencias, GSK-3 es una proteína que ha resultado estar implicada en todos los mecanismos neuropatológicos de la EA (revisión en Grimes and Jope, 2001):

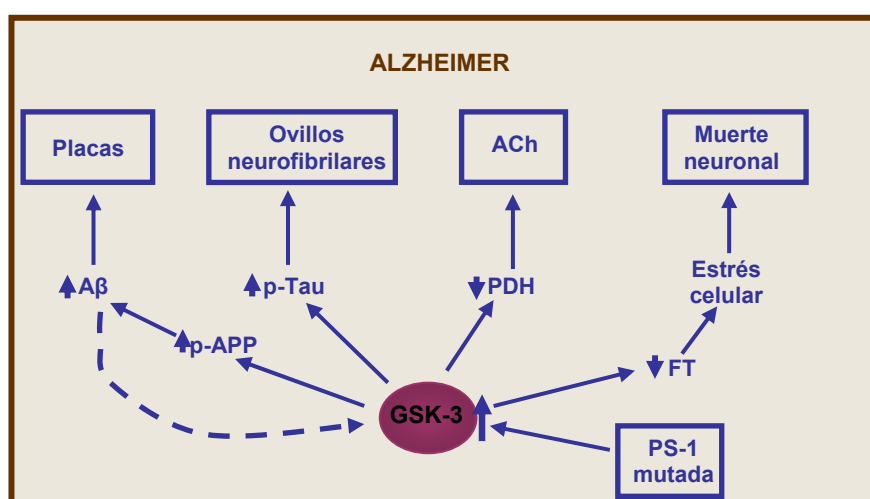


Figura 6. Esquema de implicación de GSK-3 en la enfermedad de Alzheimer.

- Esta enzima media las acciones intracelulares del **péptido amiloide (A β)**. En cultivos primarios de hipocampo tratados con A β , se vio que se activaba GSK-3 β y que esto resultaba en una acumulación de APP (Takashima et al., 1995). Además, inhibiendo GSK-3 por presencia de oligos antisentido de GSK-3 (Takashima et al., 1993) o por litio (Alvarez et al., 1999) se consigue reducir la neurotoxicidad inducida por A β . Hay estudios que atribuyen específicamente a la isoforma α de GSK-3 la implicación en el procesamiento de la APP y en la producción de A β (Phiel et al., 2003).

- GSK-3 es una de las quinasas que participan en la fosforilación de tau en los residuos que están hiperfosforilados en los **ovillos neurofibrilares (NFT)**. Muchas evidencias apuntan a un papel fundamental de la fosforilación de tau, en concreto por la quinasa GSK-3, para la formación de estos NFTs. Estudios *in vitro* con GSK-3, α y β , y tau 4R recombinantes, dieron como resultado tau fosforilado, que era reconocido por el anticuerpo PHF-1 (Hanger et al., 1992). En este mismo trabajo, realizaron estudios en tejido de pacientes de EA que revelaron que células piramidales de hipocampo, las que presentaban tinción con rojo Congo (marcador de ovillos neurofibrilares), presentaban también tinción de GSK-3 en forma de gránulos. Postulaban así, que las células piramidales de hipocampo son especialmente vulnerables en la EA. Además, en ensayos con células de mamífero se comprobó que, en presencia de GSK-3, la forma fosforilada de tau era indistinguible de la forma presente en PHFs (Lovestone et al., 1994). Esto sugería que, tanto GSK-3 α como GSK-3 β , estaban implicadas en la fosforilación de tau en PHFs en la EA. Por otro lado, hay estudios que demuestran que la quinasa cdk-5 prefosforila tau para la posterior acción de GSK-3 (rev. en (Mazanetz and Fischer, 2007).

- GSK-3 se ha relacionado con la acción de las **presenilinas (PS)**. En concreto, se ha visto que los niveles de GSK-3, tau y PS-1 correlacionan. Curiosamente, GSK-3 y tau se unen a la misma región en PS-1, lo que sugiere que PS-1 juega un papel importante en mantener la proximidad de ambas. Más aún, mutaciones en PS-1 aumenta la actividad de GSK-3 frente a tau (Takashima et al., 1998). También se ha visto que formas mutadas de PS-1 pueden disminuir la actividad de Akt, lo que se traduce en un aumento de actividad GSK-3 (Weihl et al., 1999).

- También se ha implicado GSK-3 en el **déficit colinérgico** descrito como otro de los factores que contribuyen a la enfermedad (Hoshi et al., 1996). En este estudio, se describe cómo GSK-3, activado por A β , es capaz de fosforilar e inactivar a la piruvato deshidrogenasa, resultando en una reducción de la síntesis de acetilcolina.

- Como ya se ha descrito en el apartado anterior, otra función de GSK-3 en la patogénesis de la EA es la regulación de la **apoptosis**. Además de participar directamente como factor proapoptótico, se ha demostrado que A β produce muerte celular en cultivos de neuronas de corteza, y que esta toxicidad es reversible por adición de litio (Alvarez et al., 1999). Además, se ha visto que la presencia de NFT, hecho estrechamente relacionado con un aumento de actividad GSK-3, correlaciona con una pérdida neuronal (Gomez-Isla et al., 1997).
- Por último, se ha descrito que la actividad GSK-3 es clave en la inducción de LTP (Peineau et al., 2007) y un aumento de actividad de GSK-3 puede producir **déficits en memoria** (Hernández et al., 2002); Hooper, 2007).

Para el mejor estudio de la enfermedad de Alzheimer, se han generado modelos murinos. El ratón que expresa GSK-3 de forma condicional bajo el promotor de la CaMKII α , presenta tinción somatodendrítica de PHFs en neuronas granulares, de forma similar a las neuronas en estado previo a la formación de NFT en AD, aunque no se llegan a ver los ovillos neurofibrilares. Además, también en neuronas granulares, se ha encontrado mayor incidencia de apoptosis (Lucas et al., 2001). Como ya se ha dicho antes, este ratón mostraba deficiencias en memoria espacial (Hernandez et al., 2002). Cuando se combinó con un ratón con tres mutaciones de tau presentes en FTDP-17 (Lim et al., 2001), se vio, en general, una aceleración de la neurodegeneración. El ratón resultante presentaba una disminución del volumen del giro dentado, así como la presencia de neuronas con ovillos neurofibrilares en la región CA1 del hipocampo (Engel et al., 2006a).

Por las implicaciones expuestas de una desregulación de GSK-3, en concreto un aumento de actividad, en los diferentes mecanismos que contribuyen a la enfermedad de Alzheimer, se ha sugerido el uso de inhibidores de GSK-3 en su tratamiento.

2.2 TRASTORNO BIPOLAR

El trastorno bipolar es una de las enfermedades mentales más severas. Tiene una incidencia del 3-5% en la población mundial. Sus síntomas clínicos son cambios de ánimo recurrentes que van de la depresión a la manía severa (Shastri, 2005). Tiene una elevada tasa de recaída y el riesgo de suicidio es del 15%. Los episodios maníacos se caracterizan por euforia, grandiosidad, cambios bruscos de ideas, hiperactividad, aumento de energía, escasa necesidad de sueño, irritabilidad e incapacidad de concentración. Por otro lado, los episodios depresivos se caracterizan por ánimo

depresivo, pérdida de interés, pérdida de apetito, alteración del sueño, retraso psicomotor e ideas suicidas (rev. en Kato, 2008).

Se han definido dos tipos de trastorno bipolar: trastorno bipolar I, cuando el paciente sufre uno o más episodios maníacos o mixtos, y trastorno bipolar II, que implica episodios repetidos de depresión grave alternados con hipomanía, que es una forma moderada de manía (Shastri, 2005).

Las investigaciones realizadas en familias han detectado un elevado riesgo en parientes de primer grado y un modo complejo de herencia. Estudios en gemelos revelaron una incidencia del 79% en gemelos monocigóticos y un 19% en gemelos dicigóticos, lo que apoya la influencia de factores genéticos (Shastri, 2005). Sin embargo, aún no se han identificado estos factores de riesgo genético. Esto es debido a la heterogeneidad de la enfermedad y a la posible baja contribución relativa de los genes implicados (Kato, 2008).

En relación a la neuropatofisiología, se han encontrado anomalías estructurales en hipocampo, amígdala, ganglios basales y diversas áreas de corteza prefrontal, esta última muy relacionada con depresión severa (Shastri, 2005). Estudios de neuroimagen han revelado un aumento de frecuencia de lesiones por hipersensibilidad en regiones subcorticales, un agrandamiento del ventrículo lateral y también del tercer ventrículo (Kato, 2008). Hasta el momento no se han conseguido modelos animales que reproduzcan los cambios cíclicos en el estado de ánimo. A falta de estos modelos, los estudios a nivel bioquímico van más enfocados a encontrar los mecanismos de acción de los diferentes fármacos utilizados.

Como terapia, se suelen usar antidepresivos y estabilizadores del estado de ánimo, como litio, ácido valproico (VPA), carbamazepina y lamotrigina. El más usado es el litio, descubierto en 1949 por John Cade como un fármaco eficaz para el tratamiento del trastorno bipolar. Su eficacia se ha demostrado en tratamientos a largo plazo para prevenir episodios de manía y depresión, así como para reducir el riesgo de suicidio. Para el tratamiento rápido de la fase maníaca se suelen usar normalmente los antipsicóticos, de igual eficacia, pero de actuación más rápida (Baldessarini, 2002). Una de las hipótesis para el mecanismo de acción del litio como estabilizador es la inhibición de la inositol monofosfatasa, lo que produce una reducción del mio-inositol intracelular (Harwood, 2005).

Diferentes estudios sobre los mecanismos de acción del litio apuntan a un papel de GSK-3 en los mecanismos terapéuticos y, por tanto, una posible implicación en la patología del trastorno bipolar. Existen evidencias de que la depresión es consecuencia

de una neurotransmisión de serotonina o noradrenalina inadecuadas, conocida como la hipótesis de las monoaminas. Además, se sabe que los distintos receptores de serotonina actúan de forma antagónica sobre la fosforilación en la serina 9 de GSK-3 β . Por tanto, un desequilibrio de estos receptores podría afectar a la actividad de GSK-3, que se podría regular por administración de litio (Joje and Roh, 2006). También se ha detectado en depresión una reducción en la señalización de PI3K/Akt, lo que aumentaría la actividad GSK-3 (Joje and Roh, 2006). En la depresión también existe una degeneración de las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental-ventral (VTA). Esta evidencia, junto con el hecho de que los antipsicóticos eficaces en manía bloquean la transmisión de dopamina, incluyen a la dopamina entre las posibles moléculas implicadas en el trastorno bipolar (rev en Kato, 2008). GSK-3 forma parte de la cascada de señalización dependiente del receptor de dopamina D2R (Beaulieu et al., 2004), por tanto, también una regulación de GSK-3 a este nivel podría ser parte del efecto terapéutico del litio.

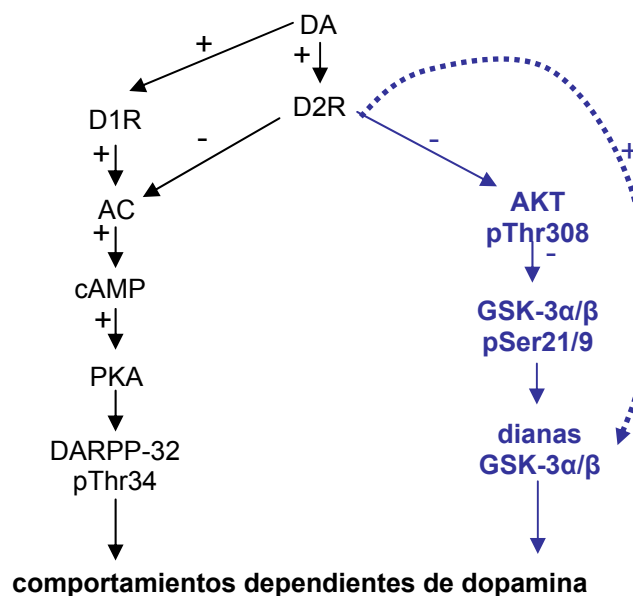


Figura 7. **Esquema de la ruta de señalización de dopamina** (adaptado de Beaulieu, 2004). La activación del receptor D2 produce una inhibición de Akt, disminuyendo así la forma fosforilada/inactiva de GSK-3 y, por tanto, aumentando la actividad de esta última, lo cual daría lugar a comportamientos dependientes de dopamina.

En 2004, el grupo de P.Klein publicó estudios en ratón que relacionan los efectos de litio crónico en comportamiento con una menor actividad GSK-3, ya que el ratón heterocigoto del mutante nulo de GSK-3 (GSK-3 β +/-), al igual que ratones tratados con litio crónico (a concentraciones terapéuticas), presentaban menor tiempo inmóviles en la

prueba *Forced swim test* (FST) y menor frecuencia de exploración en el aparato *Hole board* (O'Brien et al., 2004). En el resto de pruebas de comportamiento realizadas, incluyendo actividad total, no había diferencias en ninguno de los dos modelos. En estudios con un péptido inhibidor de GSK-3 (Kaidanovich-Beilin et al., 2004) o con un inhibidor de GSK-3 (Gould et al., 2004) encontraron el mismo efecto en FST.

En el trastorno bipolar aún no existen evidencias de una implicación directa de GSK-3 en la patología, sin embargo, la utilización de litio para su tratamiento hace pensar que otros inhibidores de nueva generación podrían igualar, e incluso mejorar, su terapia.

2.3 ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica que afecta al 0,5-1% de la población mundial. Los síntomas se dividen en positivos, negativos y cognitivos. Los positivos son los más fácilmente detectables como alucinaciones, delirios, desorden de pensamientos, y también suelen ser los que mejor responden al tratamiento. Los síntomas negativos se refieren a una menor expresión y reacción emocional, apatía, pérdida de interés, menor participación en relaciones interpersonales y conversaciones. Estos síntomas pueden confundirse con síntomas relacionados con depresión y suelen ser más difíciles de tratar. Los síntomas cognitivos son dificultad para prestar atención, baja función ejecutiva (habilidad de absorber información y tomar decisiones basadas en ésta) y déficit en memoria operativa (habilidad de retener información aprendida recientemente y utilizarla directamente) (información encontrada en <http://www.nimh.nih.gov/health/publications/schizophrenia>)

Los tratamientos sintomáticos sólo son exitosos en parte y esto hace necesario el desarrollo de nuevas terapias basadas en etiología y patogénesis. El progreso en el conocimiento de la enfermedad es lento por su heterogeneidad de fenotipo y la falta de lesiones patológicas claras como en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y otras. Es una enfermedad con alto componente hereditario pero la identificación de genes implicados ha sido difícil por ser una forma de herencia compleja y porque implica la interacción entre múltiples genes y factores ambientales (rev. en (Ross et al., 2006).

Respecto a GSK-3, los estudios en cerebros post-mortem de pacientes de esquizofrenia han dado resultados contradictorios. Los estudios de Agam y cols. ven una reducción de proteína y actividad GSK-3 en corteza frontal en tejido post-mortem

(Kozlovsky et al., 2000), aunque estudios posteriores del mismo grupo no fueron capaces de reproducir estos resultados (Nadri et al., 2004). Por otro lado, se ha visto una disminución en pSer9-GSK-3 β y Akt1 en tejido de corteza prefrontal y linfocitos de pacientes de esquizofrenia (Emamian et al., 2004). No se descarta que las diferencias obtenidas en los diversos estudios sean debidas, de una parte, a los distintos tratamientos farmacológicos de los pacientes y, de otra, a distintos métodos de conservación del tejido.

En cualquier caso, la proteína GSK-3 participa en las rutas o procesos que se han postulado como posibles causas de la patofisiología de la enfermedad. Estas posibles causas son hiperfunción en la neurotransmisión de dopamina, anomalías en el desarrollo, hipofunción de la señalización glutamatérgica y, también, alteración en la transmisión colinérgica (rev. en Jope and Roh, 2006).

Hay evidencias directas e indirectas de la implicación de GSK-3 en la **señalización por dopamina**. Por un lado, GSK-3 se encuentra por debajo de Akt en la ruta de señalización del receptor de dopamina D2R (Beaulieu et al., 2007; Beaulieu et al., 2004). La activación del receptor resultaría en inhibición de Akt y activación de GSK-3. Los autores relacionan la actividad de GSK-3, por tanto, con comportamientos dependientes de dopamina. Además, el ratón deficiente en Akt (Akt1^{-/-}), presenta un comportamiento alterado en inhibición por prepulso (PPI) en respuesta a fármacos como la anfetamina y una arquitectura dendrítica anormal, apuntando a que una desregulación de Akt/GSK-3 estaría implicada en esquizofrenia (Emamian et al., 2004; Lai et al., 2006). De forma indirecta, también se ha implicado a GSK-3 en la señalización dopaminérgica por evidencias que sugieren que la actividad de GSK-3 es modificada por distintos antipsicóticos, tanto típicos como atípicos (Alimohamad et al., 2005a; Alimohamad et al., 2005b; Li et al., 2007; Roh et al., 2007). Los antipsicóticos típicos son antagonistas de receptores D2R y los antipsicóticos atípicos bloquean, además, receptores de serotonina. Se cree que el bloqueo combinado de ambos tipos de receptores hace que los antipsicóticos atípicos sean más eficientes y produzcan menos efectos extrapiramidales. Los estudios citados anteriormente sugieren que el mecanismo de acción de ambos tipos de antipsicóticos está relacionado con una disminución de la actividad GSK-3, puesto que, aunque aumentan los niveles de ésta, también aumentan la proporción de proteína fosforilada en Ser21/9.

También se plantea que las **anomalías en el neurodesarrollo** podrían ser una de las causas del desarrollo de esquizofrenia. Como ya se ha descrito anteriormente, GSK-3 participa en la ruta de Wnt, una ruta importante en el desarrollo del sistema

nervioso. Estudios con antipsicóticos han revelado cambios en Dvl-3 (Roh et al., 2007; Sutton et al., 2007), tanto en sus niveles totales como en su fosforilación, sugiriendo una implicación de Dvl-3 en el mecanismo de acción de antipsicóticos y, posiblemente, en el desarrollo de la enfermedad. También se ha visto que Dvl-3 se encuentra asociado con el receptor de dopamina D2R y Akt (Sutton et al., 2007).

Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) es uno de los genes candidatos más destacados. DISC1 se encuentra interrumpido por una translocación balanceada entre los cromosomas 1 y 11 en una extensa familia escocesa, en la que había una gran prevalencia de enfermedades mentales como esquizofrenia, trastorno bipolar y depresión grave (rev. en Arguello and Gogos, 2006). El ratón modificado con una truncación en DISC1 (Koike et al., 2006; Kvaajo et al., 2008) presenta déficit en memoria operativa, aunque no en aprendizaje, locomoción o PPI. Se encontraron también anomalías morfológicas en hipocampo y corteza prefrontal medial (mPFC). Recientemente, en estudios con shRNA para DISC1 se ha generado un modelo *knock-down* de DISC1 (Mao et al., 2009) en el que observan que DISC1 regula la proliferación de progenitores neurales en corteza e hipocampo mediante la inhibición de GSK-3. De esta forma, establecen una interacción directa DISC1/GSK-3, además de relacionar la hiperlocomoción y el aumento de comportamientos de tipo depresivo con un aumento de actividad GSK-3, inducido por la pérdida de función de DISC1 en estos ratones.

La **neurotransmisión colinérgica y glutamatérgica** están alteradas en esquizofrenia, lo cual se ha relacionado también con GSK-3. Se ha descrito que antagonistas no competitivos de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) producen algunos síntomas de esquizofrenia, lo que sugiere una hipofunción de la transmisión glutamatérgica en esta enfermedad. La mayoría de los estudios demuestran que la estimulación de receptores de NMDA produce una disminución de pSer-GSK-3 y que el bloqueo produce el efecto contrario (rev. en Jope and Roh, 2006). Por otro lado, se ha relacionado una disminución de la actividad colina-acetil transferasa con deficiencias cognitivas (rev. en Jope and Roh, 2006). La estimulación colinérgica produce un incremento de pSer-GSK-3, lo que sugiere que una disfunción en esta transmisión podría estar produciendo una inhibición inadecuada de GSK-3, alteración que puede ser revertida por agonistas muscarínicos (De Sarno et al., 2006).

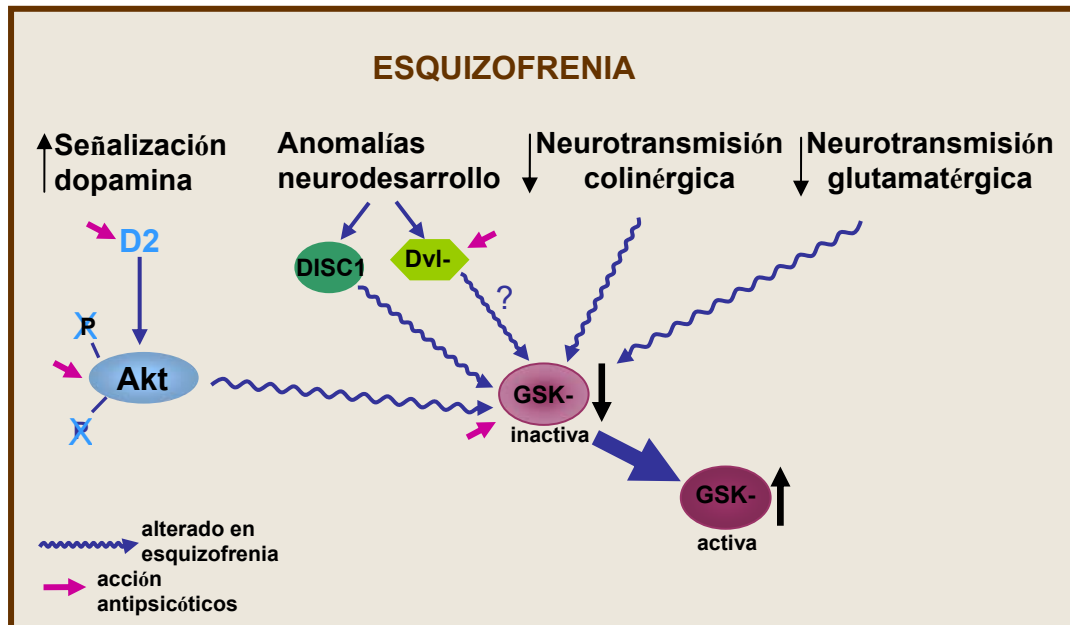


Figura 8. Esquema indicando la implicación de GSK-3 en esquizofrenia.

En resumen, las evidencias más robustas, hasta ahora, de un posible papel de GSK-3 en esquizofrenia, se derivan de su relación con Akt y la señalización por dopamina. Los datos de disminución en GSK-3 inactiva (fosforilada en serina) en ratones Akt^{-/-}, que reproducen algunas facetas de la enfermedad (Emamian et al., 2004), ya indican un equilibrio GSK-3-Akt alterado en la enfermedad. A estos datos, se suman los estudios de los efectos de antipsicóticos sobre Akt y GSK-3 (Alimohamad et al., 2005a; Alimohamad et al., 2005b; Li et al., 2007; Roh et al., 2007) y la implicación de estas dos proteínas en la señalización por dopamina, posiblemente desregulada en la patología (Beaulieu et al., 2007; Beaulieu et al., 2004). Por todo esto, se hace interesante considerar la posibilidad de tratamiento de la enfermedad con inhibidores de GSK-3.

2.4 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa genética autosómica dominante. Está causada por una expansión del triplete CAG en el gen de la huntingtina (htt), dando lugar a una expansión de la cola de poliglutaminas (poliQ) en el extremo N-terminal de la proteína. Un individuo normal tiene entre 6-35 repeticiones, a partir de 40 repeticiones se desarrolla la enfermedad. La edad de comienzo y la severidad de la enfermedad dependen de la longitud de la expansión. La EH se caracteriza por disfunción motora, declive cognitivo y alteración psicológica.

Los síntomas motores incluyen corea (movimientos continuos e involuntarios), rigidez, distonía y alteración oculomotora. La alteración cognitiva implica demencia subcortical y problemas en la adquisición de nuevos conocimientos. También son frecuentes la depresión y el suicidio, así como los síntomas maníacos y psicóticos. Por el momento no existe un tratamiento efectivo que prevenga o retrase el avance de la enfermedad (rev. en (Ortega et al., 2007)).

Las características neuropatológicas son atrofia y gliosis en el caudado putamen. Existe pérdida neuronal, principalmente de neuronas gabaérgicas espinosas de tamaño medio en el estriado y, en menor grado, en la corteza a nivel de las neuronas piramidales de capas III, V y VI. Otra marca histopatológica es la presencia de cuerpos de inclusión, que se localizan en las proyecciones neuronales, fundamentalmente en la corteza (rev. en Ortega et al., 2007).

Aunque una desregulación de GSK-3 no está entre las características de la enfermedad, existen estudios que apuntan a que una inhibición de la proteína puede ser beneficiosa. Así, en células neuronales y no neuronales transfectadas con el exon 1 de la htt acoplado a una cola de 74Q y a EGFP, se vio que el LiCl disminuía la muerte celular y el número de neuronas con agregados (Carmichael et al., 2002). Con respecto a la muerte neuronal, se obtuvieron los mismos resultados tratando con el inhibidor SB216763 o con una forma dominante negativa de GSK-3. En cambio, estos dos abordajes producían un aumento del número de células que presentaban agregados (Carmichael et al., 2002).

En modelos de EH en *C.elegans* se han realizado estudios con LiCl y mitramicina, que revelan una neuroprotección independiente del crecimiento o del envejecimiento (Voisine et al., 2007). Por último, en ratones se ha llegado a ver una mejora en la realización de pruebas de coordinación, como el Rota-rod. Esto ocurría cuando se trataban modelos animales de EH post-sintomáticos de forma crónica con LiCl (Wood and Morton, 2003).

2.5 DIABETES TIPO 2

La diabetes tipo 2 se caracteriza por una resistencia a la insulina. La causa principal de la resistencia a la insulina es la incapacidad de tejidos periféricos, como el músculo, el hígado y la grasa, de responder frente a concentraciones fisiológicas de insulina. Esta falta de respuesta a la insulina implica una deficiencia en la captación de glucosa, así como en la síntesis de glucógeno. Los mecanismos que contribuyen a la resistencia a la

insulina y, por tanto al desarrollo de diabetes tipo 2, son múltiples, pudiendo ser uno de ellos una inhibición deficiente de GSK-3 (rev. en (Jope and Johnson, 2004).

En músculo, GSK-3 estaría fosforilando a IRS-1, por tanto, produciendo un bloqueo en la señalización por insulina (Eldar-Finkelman and Krebs, 1997). En modelos animales de diabetes y obesidad existen evidencias de niveles elevados de GSK-3 (rev. en (Eldar-Finkelman, 2002). No ha sido tan claro, sin embargo, el incremento en tejidos de humanos diabéticos, donde algunos estudios han revelado un aumento de los niveles de GSK-3, pero otros no han detectado cambios en la proteína (rev. en (Henriksen and Dokken, 2006). Los ratones que sobreexpresan GSK-3 β en músculo esquelético muestran aumento de masa corporal, menor expresión de IRS-1, menor actividad de glucógeno sintasa y disminución de los niveles de glucógeno, características de la resistencia a insulina (Pearce et al., 2004). Por otro lado, el mutante nulo de la isoforma GSK-3 α presenta una elevada sensibilidad a glucosa e insulina (MacAulay et al., 2007). Este dato reforzaría la idea de utilizar los inhibidores de GSK-3 como posibles agentes terapéuticos en el tratamiento de diabetes tipo 2.

2.6 CÁNCER

En estudios iniciales, Polakis y cols. describieron que en el cáncer colorrectal existen mutaciones, principalmente en APC, que llevan a la estabilización de β -catenina (rev. en Polakis, 2000). Después, numerosos estudios han comprobado que existe una desregulación de la ruta de Wnt en gran variedad de tipos de cáncer y se han llegado a relacionar con cáncer mutaciones en 4 proteínas de ésta ruta. Todas estas mutaciones llevan a la estabilización de β -catenina y, consecuentemente, a la expresión de proto-oncogenes como ciclina D1 y c-myc (rev. en Manoukian and Woodgett, 2002). En concreto, las mutaciones encontradas en β -catenina en cáncer, impiden su fosforilación por GSK-3. Sin embargo, no se han encontrado mutaciones de GSK-3 en células tumorales (rev. en Polakis, 2000).

Existen evidencias de una regulación negativa de GSK-3 en determinados tipos de cáncer de piel, tanto en un modelo de ratón como en tejido humano, así como en cáncer de mama. En cambio, otros tipos como el cáncer de colon, de páncreas o de ovario se relacionan con una mayor actividad de GSK-3 (rev. en Luo, 2009).

Según esto, la inhibición de GSK-3 podría ser la causante de algunos tipos de cáncer y, en otros casos, ser un posible tratamiento terapéutico. En esta línea, existen estudios que demuestran que el litio induce resistencia a la quimioterapia en diferentes

líneas celulares de cáncer humano (Beurel et al., 2004). Otros estudios, en cambio, se basan en ensayos en líneas tumorales y en tumores inducidos en ratones NUDE para proponer el litio combinado con quimioterapia y así mejorar la respuesta al tratamiento (Beyaert et al., 1989). También en células de cáncer de próstata se ha aumentado la sensibilización a apoptosis vía TRAIL con inhibidores de GSK-3 (Liao et al., 2003).

En base a estas evidencias, se puede decir que los inhibidores de GSK-3 parecen buenos candidatos para mejorar la respuesta a la quimioterapia, pero sólo en determinados tipos de cáncer, puesto que en otros podría provocar el efecto contrario.

3. RELEVANCIA TERAPÉUTICA DE LOS INHIBIDORES DE GSK-3

3.1 INDICIOS Y EJEMPLOS DE UTILIDAD EN DIVERSAS PATOLOGÍAS

Como se deduce del apartado anterior, los inhibidores de GSK-3 se han postulado como buenas herramientas terapéuticas para distintas patologías como la enfermedad de Alzheimer y la diabetes tipo 2 principalmente, aunque existen evidencias que hacen que se postule su utilidad en otras como el trastorno bipolar, la esquizofrenia, la enfermedad de Huntington y el cáncer (rev. en Cohen and Goedert, 2004; Meijer et al., 2004).

Desde los años 50 el litio, el inhibidor clásico de GSK-3, es un fármaco utilizado fundamentalmente para el tratamiento del trastorno bipolar. Éste inhibe directamente a GSK-3 con una IC_{50} de 2mM (Klein and Melton, 1996). Fue este grupo el que demostró, por primera vez, que la presencia de litio inhibe la fosforilación mediada por GSK-3 de la GS, tau y la proteína fosfatasa-2 (PP2). El mismo año, el grupo de J. Woodgett, estudió el efecto de litio en células de *Drosophila* y de rata, viendo que inhibe la actividad *sgg*/GSK-3 e imita la señalización por *wingless*/Wnt. La inhibición por litio se da en las dos isoformas, α y β , de GSK-3, así como en la forma mutada S9A, que no es fosforilable (Stambolic et al., 1996). Además de esta inhibición directa, el litio puede inhibir GSK-3 de forma indirecta (De Sarno et al., 2002; Zhang, 2003) (ver fig. 2, 9, 10).

En cuanto a la inhibición directa, el litio es un inhibidor competitivo de GSK-3 con respecto al magnesio, y no al sustrato o al ATP (Ryves and Harwood, 2001). Poco después, se vio que la administración crónica de litio en ratones aumentaba la fosforilación en Ser21/9 de GSK-3 α/β , dando lugar a una inhibición indirecta de la proteína (De Sarno et al., 2002). Además, el litio puede producir un aumento de actividad y fosforilación en Akt, enzima que, a su vez, puede fosforilar GSK-3 en Ser21/9 (Chalecka-Franaszek and Chuang, 1999). Posteriormente se propuso un mecanismo de

autorregulación, por el que se amplificaría la regulación producida por litio (Zhang et al., 2003). Este mecanismo de amplificación podría explicar el que la inhibición por litio sea efectiva a dosis por debajo de su IC_{50} *in vivo*.

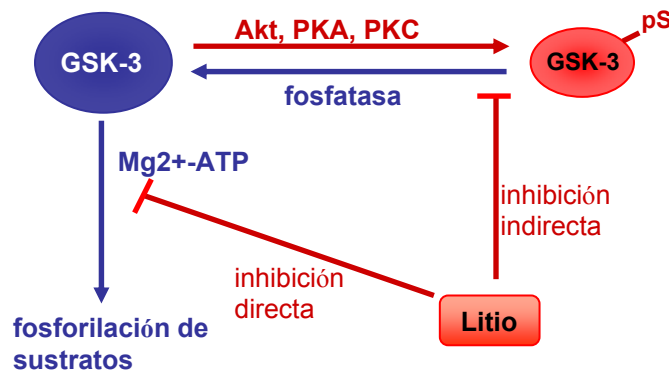


Fig 9. Esquema de la inhibición directa e indirecta de GSK-3 por litio.

Además, recientemente el grupo de M. Caron ha descrito un mecanismo por el cual Akt y GSK-3 estarían implicados en la señalización por DA a través del receptor D2, pero independiente de AMPc, siendo Akt y GSK-3 responsables de comportamientos dependientes de dopamina (Beaulieu et al., 2004). El litio, en este caso, se encargaría de deshacer el complejo que forman la proteína de soporte β -arrestina 2, Akt y PP2A. De esta forma, Akt no sería inactivada por PP2A y se favorecería la forma inactiva de GSK-3, pSer21/9-GSK-3 α/β (Beaulieu et al., 2007). Para investigar las acciones de litio y β -arrestina 2, generaron un mutante nulo de β -arrestina 2 que no respondía ni bioquímicamente ni en su comportamiento a la administración de litio (Beaulieu et al., 2008).

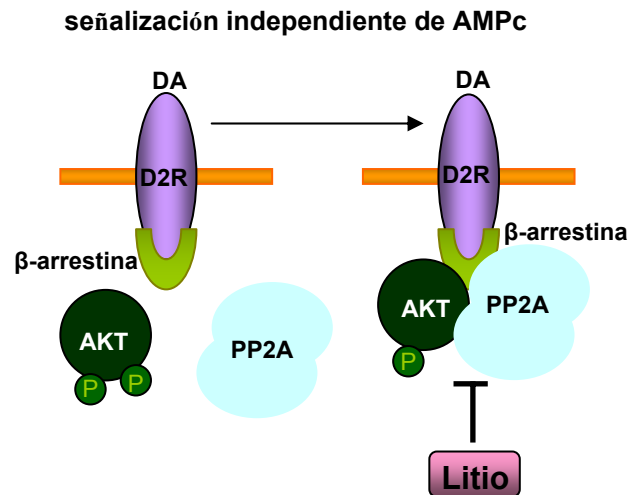


Figura 10. **Mecanismo de actuación del litio sobre el complejo formado por β -arrestina.** Una vez terminada la señalización clásica mediada por proteínas G, el receptor D2 sufre un proceso de internalización, tras el cual forma el complejo con β -arrestina, AKT y PP2A. En este complejo, Akt es defosforilado por PP2A. El litio produce la destrucción de este complejo, favoreciendo la forma fosforilada/activa de Akt y, por tanto, la fosforilación/inactivación de GSK-3.

Sin embargo, el litio no solo inhibe a la GSK-3. Más concretamente, el litio inhibe otras actividades como la inositol polifosfato 1-fosfatasa (IPPasa), la inositol monofosfato fosfatasa (IMPasa), la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa), la bisfosfato nucleotidasa (BPNasa) y la fosfoglucomutasa (PGM) (Gould et al., 2006). Esto ha llevado a que en la actualidad se estén empleando grandes esfuerzos en la búsqueda de nuevos inhibidores de GSK-3 más potentes y selectivos. Los inhibidores encontrados hasta ahora suelen ser moléculas de bajo peso molecular, heterociclos planos e hidrófobos y, la mayoría, competidores por el sitio de unión a ATP (Meijer et al., 2004).

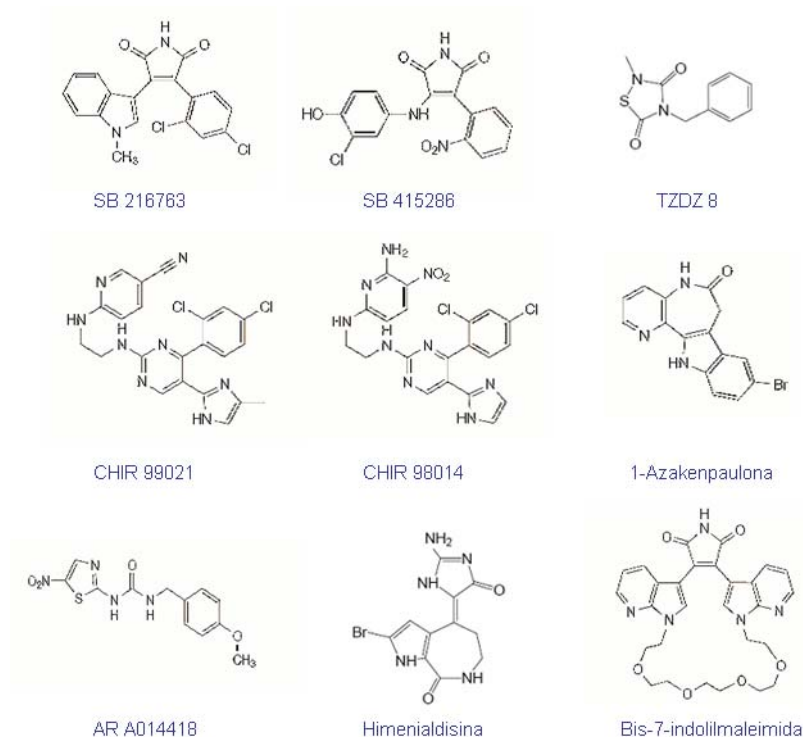


Fig 11. Algunos de los nuevos inhibidores de GSK-3

Se cree que, para aumentar su especificidad, sería oportuno buscar moléculas que ocupen el sitio de unión del fosfato de un sustrato prefosforilado (Cohen and Goedert, 2004). Entre los nuevos inhibidores, los llamados TZDZ, han sido los primeros compuestos desarrollados que no son ATP competitivos. La ventaja que presentan estos inhibidores es un mayor grado de selectividad, puesto que no inhiben otras quinasas (Martinez, 2006).

Con respecto a alteraciones en el metabolismo de glucosa, los inhibidores de GSK-3 han resultado ser efectivos en la disminución de los niveles de glucosa en sangre y estimular el transporte de glucosa en músculo esquelético de ratas ZDF (*Zucker Diabetic Fatty*), modelo de diabetes. También son capaces de aumentar la expresión de IRS-1 y de estimular la captación de glucosa en músculo esquelético humano (rev. en (Jope and Johnson, 2004). Por otro lado, ensayos en líneas celulares de hígado humano indican que inhibidores de GSK-3 aceleran la conversión de glucógeno en glucosa por activación de glucógeno sintasa y, además, reducen la producción de glucosa (rev. en (Cohen and Goedert, 2004). Estos resultados han sido comprobados *in vivo*, en ratas ZDF (rev. en Henriksen and Dokken, 2006).

También existen evidencias de que el tratamiento con inhibidores puede ser beneficioso en enfermedades del sistema nervioso. En concreto, para el tratamiento de la EA, existen numerosos ejemplos (Cohen and Goedert, 2004).

Con respecto a la acumulación de A β , se ha visto disminución de ésta en distintos tipos celulares transfectados con APP o en cultivos primarios de ratones con APP mutado, al tratar con litio o kenpaulona (Cohen and Goedert, 2004; Phiel et al., 2003; Sun et al., 2008). En modelos de la enfermedad, como el ratón transgénico APPV717F, el litio es capaz de reducir la producción de A β (Ryder et al., 2003). También *in vivo*, en ratas con infusión intracerebroventricular (ICV) de A β y tratadas con el inhibidor selectivo SB-216763, se vio una disminución de la toxicidad causada por éste (Hu et al., 2009).

En relación a la hiperfosforilación de tau, el tratamiento con LiCl ha podido revertir ésta en células y en cerebro de rata (Cohen and Goedert, 2004; Hong et al., 1997; Munoz-Montano et al., 1997; Stambolic et al., 1996). Además, exponiendo células transfectadas a indirubinas, paulonas, himenialdisina o AR-A014418, también se conseguía reducir la fosforilación de tau (Bhat et al., 2003; Cohen and Goedert, 2004; Meijer et al., 2004). En modelos animales, la inhibición de GSK-3 por administración de LiCl o de AR-A014418 (AstraZeneca) a ratones que expresan tau humano mutado, consigue prevenir la hiperfosforilación y agregación de tau y, también, disminuir el grado de degeneración axonal (Noble et al., 2005). En otros modelos animales, como el ratón que sobreexpresa GSK-3 y tau humano mutado en 3 sitios implicados en FTDP-17, el tratamiento crónico con litio puede prevenir la hiperfosforilación de tau y la formación de ovillos neurofibrilares (Engel et al., 2006a).

Cabe destacar que un inhibidor de GSK-3 no competitivo por ATP, el NP-12 (Noscira) ya se encuentra en la fase II de las pruebas clínicas, lo que apoya aún más la utilidad de inhibidores como terapia en la enfermedad de Alzheimer.

3.2 EVIDENCIAS DE POSIBLES EFECTOS ADVERSOS DE LOS INHIBIDORES DE GSK-3

Los primeros estudios en que se describió una toxicidad por inhibición de GSK-3 fueron desarrollados en 1989 por Beyaert y cols. Tratamientos con litio en células tumorales murinas y humanas revelaron un aumento de la toxicidad producida por TNF α (Beyaert et al., 1989). Después se demostró, en células de cáncer de próstata

humano, que otros inhibidores específicos de GSK-3, así como siRNA de GSK-3 potenciaban la apoptosis inducida por TRAIL (Liao et al., 2003). Más recientemente, en células B de leucemia linfoide, la inhibición de GSK-3 por inhibidores específicos llevó al silenciamiento de NFκB y, en consecuencia, a un aumento de apoptosis (Ougolkov et al., 2007).

Estudios en células no tumorales, como cultivos primarios de neuronas corticales de rata, indicaron que tratamientos prolongados con litio podían producir una mayor incidencia de apoptosis (Alvarez et al., 1999). Posteriormente se vió que el pretratamiento con litio o inhibidores de GSK-3 producía un aumento del efecto tóxico producido por Fas en células Jurkat y células inmortalizadas de hipocampo de ratón (Song et al., 2004).

Ya en animales, las primeras evidencias fueron en 1995 por He y Domínguez, en trabajos simultáneos e independientes en embriones de *Xenopus*. Ambos grupos demostraron que formas dominantes negativas de GSK-3 daban lugar a la formación ectópica del eje dorsoventral (Dominguez et al., 1995; He et al., 1995). Otra evidencia clara de la toxicidad por inhibición de GSK-3 es el hecho de que el ratón knock out de GSK-3β, generado por Hoeflich y cols en 2000, resultó no ser viable (Hoeflich et al., 2000). Muy recientemente, estudios en rata han revelado que la inhibición de GSK-3 produce un mayor grado de apoptosis y de respuesta inflamatoria (Hu et al., 2009).

A la vista de los resultados obtenidos en relación a GSK-3 en cáncer, existe una gran preocupación por las consecuencias que podrían tener los tratamientos prolongados con inhibidores de GSK-3. Numerosos autores postulan que los inhibidores de GSK-3 podrían ser beneficiosos en el tratamiento de enfermedades como la EA o diabetes tipo 2, pero muestran preocupación por los efectos tumorigénicos que podrían tener tratamientos prolongados (Cohen and Goedert, 2004; Eldar-Finkelman, 2002; Meijer et al., 2004).

Hasta ahora, el uso más extendido de inhibidores de GSK-3, en concreto del litio, ha sido como tratamiento para el trastorno bipolar. Como ya se ha descrito anteriormente, es un tratamiento efectivo pero tiene el inconveniente de su estrecha ventana terapéutica (que va desde 0,6mM a 1,4mM), debido a su toxicidad a dosis mayores (rev. en Macritchie, 2004). Además, incluso en el rango terapéutico, los efectos adversos son frecuentes. Estos efectos adversos pueden ser síntomas leves o trastornos graves, según el grado de intoxicación. En casos de intoxicación leve o moderada pueden aparecer náuseas, diarrea, visión borrosa, mareo, temblor leve, debilidad muscular o adormecimiento. En intoxicaciones más severas se ven afectados los ganglios

basales, produciendo síntomas propios del parkinsonismo o corea, los cuales pueden progresar a espasmos, coma e incluso muerte (rev. en Baldessarini, 2002; Young and Newham, 2006). Hay que tener en cuenta que los efectos adversos leves pueden ocurrir en tratamientos prolongados sin llegar a la intoxicación, es decir, en casos con niveles mantenidos dentro del rango terapéutico. Los mecanismos por los que se producen estos síntomas se desconocen por el momento.

A pesar de los efectos secundarios del litio y la necesidad de una estrecha monitorización del tratamiento, el litio sigue siendo, después de varias décadas, el tratamiento más utilizado en el trastorno bipolar. En este sentido se están tratando de encontrar nuevos fármacos que reproduzcan o mejoren los beneficios del litio, minimizando sus efectos secundarios.

OBJETIVOS

En esta tesis nos hemos propuesto realizar un estudio de la inhibición de GSK-3 en neuronas de cerebro de ratón adulto basándonos en abordajes genéticos y farmacológicos. Para ello no hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1. Análisis de las consecuencias neurológicas de la inhibición de GSK-3 en ratones por transgénesis de una forma dominante negativa**
 - 1.1 Generación del ratón transgénico Tet/DN-GSK-3
 - 1.2 Análisis comportamentales
 - 1.3 Análisis bioquímico e histológico
- 2. Análisis de las consecuencias neurológicas de la inhibición de GSK-3 en ratones por administración crónica de litio**
 - 2.1 Diseño del protocolo de administración crónica de litio
 - 2.2 Análisis comportamentales
 - 2.3 Análisis bioquímico e histológico

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

Reactivos como el Tris, HEPES, EDTA, EGTA, fluoruro de fenilmetilsulfato (PMSF), 2-mercaptoetanol, paraformaldehído (PFA), albumina de suero bovino (BSA), SDS y Tritón X-100 se obtuvieron de Sigma.

Otros reactivos como glicina, glicerina, sacarosa, cloruro de magnesio (MgCl_2), cloruro sódico (NaCl), fluoruro sódico (NaF), cloruro de litio (LiCl) y Tween-20 se obtuvieron de Merck.

Los reactivos obtenidos de Calbiochem fueron el β -glicerofosfato y el ácido okadaico.

2. OLIGONUCLEÓTIDOS Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la detección de la construcción DN-GSK-3 (R1, R2, R3, R4) se utilizaron los oligonucleótidos A y B, para la detección de la construcción CaMK-tTA (tTA) se utilizaron los oligonucleótidos C y F.

GSK-3A	5'-CATGGTCAGGTCATGGATGAGC-3'
GSK-3B	5'-TAATCAGCCACTGATCCACCCAG-3'
tTA-C	5'-ACTAAGTCATCGCGATGGAGC-3'
tTA-F	5'-CGAAATCGTCTAGCGGTCGG-3'

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos A, B, C y F

El protocolo de amplificación utilizado fue el mismo para las dos parejas de anticuerpos.

<i>1 ciclo</i>	<i>29 ciclos</i>	<i>1 ciclo</i>
94°C 5 min	94°C 1 min	
53°C 1 min	53°C 1 min	72°C 5min
72°C 1,5 min	72°C 1,5 min	

Tabla 3. Protocolo de amplificación

3. ANTICUERPOS

La relación de anticuerpos utilizados en esta tesis se resume en la siguiente tabla:

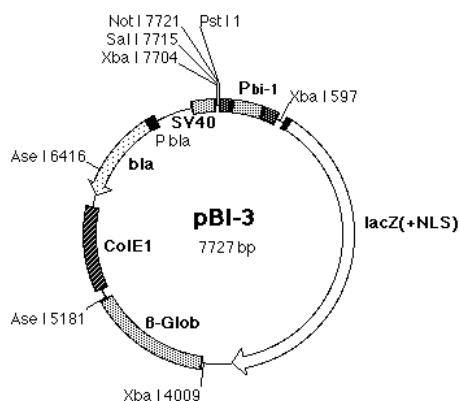
<i>Anticuerpos Primarios</i>	<i>Especie</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Dilución WB</i>	<i>Dilución IHQ</i>
anti- β -Galactosidasa (β -Gal)	Conejo	ICN Biomed. Cappel	1:5000	1:5000
anti-GSK-3 β	Ratón	BD Biosource	1:1000	
anti-pSer 21/9 GSK-3 α/β	Conejo	Cell Signaling	1:500	
AT-8 (Tau pSer 199/202)	Ratón	Innogenetics	1:100	
PHF-1 (Tau pSer 396/404)	Ratón	Dr. Davies	1:100	
anti- β -Catenina	Ratón		1:100	
anti- β -Actina	Ratón		1:5000	
Caspasa-3 activada (Asp 175)	Conejo	Cell Signaling		1:50
NeuN	Ratón			1:100
anti-pSer 9 GSK-3 β	Conejo	Cell Signaling	1:500	1:100
anti-NFATc3 (M-75)	Conejo	Santa Cruz		1:200
anti-NFATc4 (H-74)	Conejo	Santa Cruz		1:200
anti-FasL (N-20)	Conejo	Santa Cruz		1:300

Tabla 4. Relación de anticuerpos utilizados y sus diluciones

4. CLONACIÓN DEL GEN DN-GSK3 EN EL PLÁSMIDO PBI 3

Partimos del vector pBI-3-xGSK-3 β que fue utilizado para generar los ratones Tet/GSK-3 β (Lucas et al., 2001). Para obtener la construcción del vector pBI-3-xGSK-3 β , Lucas y colaboradores obtuvieron el cDNA de xGSK-3 β wt del plásmido pXT7 proporcionado por Isabel Domínguez que, además, incorporaba el epítipo myc en el

extremo N-terminal (Dominguez et al., 1995). La secuencia myc-xGSK-3 β se cortó con HindIII y se clonó en pCRII para dotarla de dianas de restricción flanqueantes adicionales para facilitar su posterior inserción en el plásmido pBI-3.



El plásmido pCRII-myc-xGSK-3 β fue cortado en NseI /NotI y el fragmento resultante fue insertado en pBI-3 y digerido con PstI/NotI. Resultando así, el plásmido pBI-3-xGSK-3 β .

Para el presente proyecto usamos el plásmido pcDNA3-R85-xGSK-3 β (Munoz-Montano et al., 1999). Éste contiene el cDNA de xGSK-3 β con la mutación puntual (K85R) que lo convierte en una forma dominante negativa, igualmente con un epítipo myc en el extremo N-terminal. pcDNA3-R85-xGSK-3 β se digirió con HindIII y el fragmento de 1,5 Kb resultante se clonó en el plásmido pBI-3-xGSK-3 β , que previamente había sido liberado de la secuencia wtGSK-3 β por digestión con HindIII. La orientación adecuada del inserto se verificó mediante digestión con XhoI. El plásmido resultante se denominó pBI-3-R85-xGSK-3 β .

El plásmido pBI-3-R85-xGSK-3 β fue secuenciado para comprobar que no se habían cometido errores en el proceso de clonaje. Para la secuenciación se utilizó el oligonucleótido R85-xGSK3 β (ISOGEN) complementario a las bases 1-14 del plásmido pBI3 5'-CCGAATTCCTGCATCAAGCTT-3' mediante el uso del secuenciador automático del Sidi (UAM). Así se verificó que, efectivamente, se trataba de la mutación K85R y que el marco de lectura era correcto. Según el resultado de la secuenciación, la posición 88 de xGSK-3 es una Leu a diferencia de lo previamente depositado en las bases de datos (Dominguez et al., 1995), donde figura una Pro en la posición 88.

En la secuencia de GSK-3 β , tanto de especies inferiores (tales como *Drosophila melanogaster*: shaggy) como de especies superiores (tales como *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens*), en la posición 88 se encuentra una Leu. Es coherente, por tanto, pensar que exista un error en la secuencia publicada de *Xenopus* por Domínguez y que la posición 88 sea, como en las demás especies, una Leu.

5. GENERACIÓN DE RATONES R85TetO

La construcción R85-xGSK3 β en pBI3 fue digerida con AseI y el fragmento de 8.5 Kb resultante (que contiene el promotor bidireccional, los cDNAs de β -Gal y DN-xGSK-3 β y sus correspondientes secuencias estabilizadoras del mRNA) fue purificado por Gene Clean (Bio101). Se pasó por filtros RPM101 y se diluyó en tampón de microinyección: 7,5mM Tris pH 7,4; 0,2mM EDTA. A una concentración de 2-5 ng / μ l. Esta solución de DNA se microinyectó en oocitos fecundados de la cepa FVB en el estadio de una célula con dos pronúcleos.

6. MANTENIMIENTO DE LA COLONIA DE RATONES

Los ratones utilizados en los experimentos fueron mantenidos en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Se agruparon en un máximo de 5 animales por jaula con agua y comida (Harlan Iberica) *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada y con ciclos de luz-oscuridad de 12h con encendido de luz a las 07:00h. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas aprobadas por el comité ético del CSIC.

Tratamiento con Doxiciclina en ratones Tet/DN-GSK-3

Para los estudios bioquímicos, los ratones Tet/DN-GSK-3 β y sus controles (hermanos de camada) recibieron doxiciclina 2 mg/ml en el agua de bebida *ad libitum* durante seis semanas. Se había demostrado previamente que esta dosis resulta en un apagado total del transgén en un modelo condicional similar que sobreexpresa la forma salvaje de GSK-3 (Engel et al., 2006a; Engel et al., 2006b; Lucas et al., 2001). Para estudiar la reversión del fenotipo de comportamiento se administró doxiciclina con un paradigma diferente. En este caso, recibieron doxiciclina 2mg/ml durante la primera semana, 1mg/ml durante la segunda semana y el resto del tiempo, hasta los cuatro

meses, se administró a concentración 0,5mg/ml. Se eligió este protocolo basándose en la observación previa de que tratamientos largos con doxiciclina a dosis elevada llegan a empeorar el desarrollo del test de Rota-rod en animales salvajes (Diaz-Hernandez et al., 2005). Este paradigma también lleva a un apagado total del transgén.

Tratamiento crónico con litio en ratones salvajes y *lpr*

Para este estudio se utilizaron ratones C57/BL6 (Harlan) y ratones deficientes en receptor de Fas (ratones *lpr*) (Jackson), que también están mantenidos sobre un fondo genético C57/BL6 (Harlan). Un grupo de ratones machos de 8 semanas de edad recibieron comida que contenía 1,7 g/kg de LiCl (Harlan Teklad) durante 2 semanas, seguidas de 6 semanas recibiendo comida que contenía 2,55 g/kg de LiCl. El grupo de ratones controles se mantuvo en condiciones paralelas y fue alimentado con la comida habitual del animalario, sin litio. Para prevenir la hiponatremia, los ratones recibieron agua y NaCl (450mM) *ad libitum*. Semanalmente, se realizaron análisis de litio en sangre por espectrometría de masas (ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry).

En el caso de los ratones *lpr*, se comprobó que si se mantenían en la dosis 2,55g/Kg de litio, las litemias que se obtenían eran muy elevadas (mayores de 1,6mM), superándose el rango terapéutico. Para conseguir mantenerlos en las litemias equivalentes a las de los ratones salvajes, hubo que bajar la dosis de las 2 últimas semanas a 2,3 g/kg y 2,15g/kg de litio en la comida.

7. INMUNOHISTOQUIMICA

En todos los experimentos los ratones controles y transgénicos ó tratados fueron procesados en paralelo y tratados idénticamente. Los ratones fueron sacrificados por CO₂ e inmediatamente se diseccionaron sus cerebros en una placa sobre hielo. El hemisferio derecho fue diseccionado para bioquímica. El hemisferio izquierdo se proceso para inmunohistoquímica sumergiéndose en paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón Sorensen durante una noche y, posteriormente, fueron crioprotegidos por inmersión en sacarosa al 30% en PBS durante tres días. Los cerebros fueron incluidos en OCT (Sakura Finetek) y congelados a -80°C. Se cortaron secciones de 30 µm en un criomicrotomo Leica y se mantuvieron en flotación en glicol a -20°C.

Para la tinción, se pretrataron con H₂O₂ 0,3% en PBS durante 45min. Se lavaron con PBS y se bloquearon con BSA 1%, FBS 0,5% y Triton X-100 0,2% en PBS. Se incubaron las secciones durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente. Seguidamente se usó el kit Elite Vectastain ABC (Vector Laboratorios) y, por último, se reveló utilizando diaminobenzidina (SIGMAFAST™ DAB, Sigma), parándose la reacción con agua. Las secciones se montaron sobre portas utilizando Fluor Save Reagent (Calbiochem) como medio de montaje.

8. INMUNOFLUORESCENCIA

Tras dos lavados de 5 min con PBS, se trataron las secciones con Triton X-100 0,1% en PBS durante 15 min y con glicina 1M durante 30 min. Se lavaron con PBS durante 5 min. y se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 45 min. Se incubaron con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en BSA 1% en PBS durante 1h, a temperatura ambiente y en oscuridad. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Oregon Green 488 goat anti-mouse 1/200 (Molecular Probes) y Texas Red goat anti-rabbit 1/400 (Molecular Probes), diluidos igualmente en BSA 1% en PBS. Se lavaron dos veces con PBS en oscuridad y se incubaron con DAPI 1/5000 (Calbiochem) durante 10 min. Finalmente se hizo un lavado con H₂O milliQ y se montaron con Fluor Save Reagent (Calbiochem).

9. TUNEL

Los ratones fueron anestesiados con una solución xylazine/ketamine y perfundidos transcardialmente con PFA 4% en Sorensen durante diez minutos. Se postfijaron en PFA 4% durante 2 horas a 4°C y después se crioprotegieron en disolución de sacarosa al 30% en PBS durante 3 días. Las secciones de 30 µm se obtuvieron como se ha descrito anteriormente. La tinción de TUNEL (**T**dT-mediated X-d**U**TP **N**ick **E**nd **L**abeling) se realizó siguiendo el protocolo In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche). Para revelar se utilizó DAB (Sigma) y se montaron de igual forma a la descrita para la inmunohistoquímica.

10. ANALISIS DE PROTEINAS POR ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCION (WESTERN BLOT)

Los extractos de proteínas de las distintas estructuras de cerebro se prepararon con el tampón de homogeneización: Hepes 20mM, pH 7,4; NaCl 100mM, NaF 50mM, EDTA 5mM, inhibidores de proteasas Complete (Roche), ortovanadato sódico (NaVO_4) 1mM, ácido okadaico 2 μM , pirofosfato sódico 5mM y glicerofosfato sódico 30mM. Se homogeneizaron en hielo utilizando un homogeneizador de vidrio (potter) con émbolo de teflón y se centrifugaron a 15000 x g durante 15min a 4°C. Se conservó el sobrenadante en alícuotas. A una de las alícuotas se le añadió tampón de ruptura (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2 % SDS, 0.1 % azul de bromofenol, 10 % glicerol), se hirvió y se conservó a -70°C. Para medir la concentración de proteína se utilizó el método Bradford (Biorad Protein Assay, Biorad). Para la electroforesis, se cargaron 15 μg de los extractos en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Se transfirió a membranas de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) durante 1h a 150mA. Las membranas se bloquearon durante 1h en leche al 5% en PBS-Tween 20 ó en BSA al 5% en PBS-Tween 20 (cuando se utilizaron anticuerpos contra epítomos fosforilados) y se incubaron con los anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Se lavaron con PBS-Tween 20 y se incubaron con los anticuerpos secundarios: polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/HRP y polyclonal rabbit anti-rabbit immunoglobulins/HRP (DAKO Cytomation) durante 1h 30 min. Finalmente se revelaron con ECL (Perkin Elmer).

11. ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINASA DE GSK-3

Se homogeneizó el tejido de hipocampo, estriado, corteza y cerebelo en tampón: 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM VO_4Na , 1% Triton 100-X, 1mM EDTA, 1mM EGTA y mezcla de inhibidores de proteasas Complete (Roche). Los homogenizados se centrifugaron a 14000 x g durante 15 minutos y los sobrenadantes fueron recogidos para el análisis de actividad GSK-3. Como sustrato se utilizó el péptido GS1 (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQS*EDEE) que contiene la serina 21 fosforilada (Stambolic and Woodgett, 1994). Los sobrenadantes se incubaron a 37 °C con 66 μM del péptido GS1 en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 50 μM (1000 cpm/pmol; NEN-Dupont) en Tris-HCl 25 mM pH 7.5, DTT (Dithiothreitol) 1 mM, MgCl_2 10 mM y NaCl 20 mM ó LiCl 20 mM, según correspondiese. La reacción se paró añadiendo las alícuotas sobre papel de

fosfo celulosa P81. Los filtros fueron procesados en contador de centelleo, como se describió en (Engel et al., 2006b). La actividad específica de GSK-3 se calculó como la diferencia entre la actividad en presencia de NaCl 20mM y la actividad en presencia de LiCl 20mM.

12. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO

Campo Abierto (Open Field Locomotion). En el caso de las primeras pruebas para caracterizar la actividad locomotora global de los ratones Tet/DN-GSK-3 β y en el ensayo con anfetamina, se utilizó el método descrito en el protocolo SHIRPA (Rogers et al., 1997), siguiendo un protocolo adaptado del test de Irwin (Irwin, 1968). Se realizó en una caja de Perspex (medidas 55x33x18 cm) y la parte externa del suelo se dividió en cuadrados de 11 cm de lado. El ratón se transfirió a la caja colocándose en una de las esquinas. La actividad locomotora horizontal se midió como número de cuadrados atravesados con las 4 patas durante un tiempo determinado.

Las pruebas realizadas a los ratones salvajes tratados con litio se realizaron en un aparato Open Field (Med Associates, Inc.) para ratones que consiste en una caja de dimensiones 29x29 cm con 16 fotocélulas para medir actividad horizontal y 8 fotocélulas para medir actividad vertical.

Rota-rod. La actividad motora fue medida en un accelerating Rotarod apparatus (Ugo Basile, Comerio, Italy). Inicialmente, cada ratón fue entrenado durante dos días. El primer día se hicieron 4 sesiones de 1 minuto a velocidad fija de 4 r.p.m, con intervalos de 1 hora. El segundo día se aumentó el tiempo a 2 minutos: el primer minuto a 4 r.p.m, seguido de un minuto a 8 r.p.m. Una vez realizados los entrenamientos, el tercer día se procedió a la realización de las pruebas, que se desarrollaron durante 5 minutos con una aceleración progresiva de 4 a 40 r.p.m. Se hicieron dos pruebas diarias (mañana/tarde) durante 2 días, en total 4 pruebas. En los ensayos de aceleración, se midió la latencia en caer de cada ratón.

Test de la barra vertical (Vertical pole test) Se realizó siguiendo el protocolo descrito en (Matsuura et al., 1997). El ratón se coloca mirando hacia arriba en la parte superior de una barra de 1 cm de diámetro y 50 cm de largo, previamente recubierta por cinta para conseguir una superficie rugosa. Se tiene en cuenta el tiempo que el ratón necesita para bajar hasta la base. Para el tiempo total se tuvo en cuenta el máximo de 120s y para el tiempo de bajada se considero un máximo de 60s.

Test de patrón de huellas (Footprint pattern test) Se realizó como está descrito en (Barlow et al., 1996). Las patas traseras del ratón se sumergieron en tinta azul y fue colocado a la entrada de un túnel oscuro (9.2 cm × 6.3 cm × 35.5 cm). Las huellas se recogieron en un papel de filtro blanco colocado en el suelo del túnel. Cada ratón repitió el test tres veces. La longitud de pisada se calculo midiendo la distancia entre dos pasos de la misma pata (p.e. distancia entre huella de la pata trasera derecha y siguiente huella de la pata trasera derecha). Se excluyeron del análisis los primeros y últimos 7 cm del recorrido. Para calcular la media de la longitud de pisada solo se tuvieron en cuenta las tres pisadas mas largas de cada pata. Para calcular la variabilidad de pisada se resto la pisada mas corta a la pisada mas larga de cada ratón.

Análisis del modo de andar (DigiGait) Para este estudio, en ratones salvajes tratados con litio, se utilizó el aparato DigiGait™ (Mouse Specifics, Inc., Boston, MA). Este aparato consiste en una cinta andadora transparente de velocidad regulable sobre la que se coloca al ratón confinado en un habitáculo de metacrilato. La imagen digital se obtiene de una cámara colocada bajo la cinta que recoge la imagen de las pisadas. Los animales realizan el test sin pre-entrenamiento. Los ratones con tratamiento crónico de litio y sus controles lo hicieron a la velocidad de 18 y 24 cm/s. Para mejorar el contraste de la imagen, se pintaron las patas de los animales con colorante alimenticio rojo. Básicamente, el programa dibuja el área de la imagen de la pata en contacto con la cinta en cada momento. A lo largo de toda la secuencia de tiempo, proporciona una señal digital dinámica a partir de la cual se determinan todos los parámetros (Hampton et al., 2004).

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo con los programas Origin 7.0 y SPSS 15.0. Los datos se han representado como los valores medios \pm S.E.M. Primero se analizó si los datos se ajustaban a una distribución normal, realizando la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de muestras que seguían una distribución normal, se realizó una prueba ANOVA de una vía. En el caso de distribuciones no normales de los datos se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para determinar la significancia estadística. El nivel de significancia mínimo aceptado ha sido $p > 0,05$.

RESULTADOS

EFFECTOS NEUROLÓGICOS DE LA INHIBICIÓN SOSTENIDA DE GSK-3 MEDIANTE ABORDAJE GENÉTICO

1. Diseño del ratón DN-GSK-3

Se sabe que los ratones knock-out de GSK-3 β presentan letalidad embrionaria (Hoeftlich et al., 2000). Como alternativa para explorar las consecuencias de una disminución sostenida de la actividad de GSK-3 en tejido adulto, decidimos generar un ratón con expresión condicional de una forma dominante negativa (DN) de GSK-3. En concreto, se eligió la forma mutante K85R de GSK-3 (DN-GSK-3) cuya eficacia para reducir la actividad GSK-3 ya había sido descrita con anterioridad (Dominguez et al., 1995).

Para la expresión condicional del transgén se empleó el sistema regulado por tetraciclina. Este sistema ya había sido utilizado previamente en nuestro grupo para la generación de ratones modelo de enfermedades neurodegenerativas (Lucas et al., 2001; Yamamoto et al., 2000). De forma similar, decidimos generar ratones con el transgén DN-GSK-3 asociado a un promotor que responde a tetraciclina (tetO) (Fig. 12). Estos ratones se pueden cruzar con líneas de ratones que expresan el transactivador tTA, (también conocido como Tet-Off) en determinados tejidos. Así, los ratones doble-transgénicos expresarían el transgén DN-GSK-3 de forma regulada por tetraciclina (Fig. 12). Existen numerosas líneas disponibles de ratones que expresan tTA (Lewandoski, 2001). En este caso, nos propusimos explorar las consecuencias neurológicas de una inhibición sostenida de GSK-3 utilizando un ratón que expresa tTA bajo el promotor de la CaMKII α , que es un promotor postnatal específico de neuronas de cerebro anterior (Mayford et al., 1996).

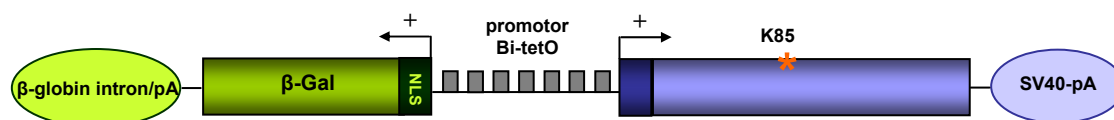


Figura 12. **Construcción DN-GSK-3.** Esquema de la construcción DN-GSK-3 usada para generar el ratón. El promotor bidireccional Bi-TetO está acoplado, en una dirección, a la secuencia de cDNA K85R-GSK-3 β (DN-GSK-3) y en la otra dirección, a la secuencia de la β -galactosidasa (β -Gal).

Para la generación del transgén DN-GSK-3, la secuencia de la forma mutada K85R-GSK-3 se clonó en una construcción que contenía el promotor bidireccional tetO (Bi-tetO) con un reportero β -galactosidasa (β -gal) en la orientación contraria (Fig. 12). Según experiencias previas en la generación de ratones transgénicos con el sistema regulado por tetraciclina, se sabía que el sitio de inserción y/o el número de copias de la construcción tetO influía en el patrón final y el nivel de transactivación por tTA (Lucas et al., 2001; Yamamoto et al., 2000). La secuencia reportera β -gal en la construcción DN-GSK-3 permite, por un lado, un análisis del patrón de expresión en el doble transgénico (Tet/DN-GSK-3), en las diferentes líneas fundadoras por tinción con X-gal o por inmunohistoquímica contra β -gal; por otro lado, también permite comprobar la eficiencia del silenciamiento del transgén tras administración de tetraciclina (Díaz-Hernandez et al., 2005; Engel et al., 2006b; Lucas et al., 2001; Yamamoto et al., 2000).

2. Generación de ratones Tet/DN-GSK-3 y mapeo de la expresión del transgén

Tras la microinyección se obtuvieron cuatro líneas transgénicas independientes con la construcción DN-GSK-3, que se nombraron R1, R2, R3 y R4 (Fig. 13). Para el estudio de la inhibición sostenida de GSK-3 en neuronas adultas, estas líneas de ratones fueron cruzadas por la línea de ratones CaM-KII-tTA. En concordancia con la naturaleza postnatal del promotor, el porcentaje de dobles transgénicos obtenido estaba próximo al 25% esperado para las cuatro líneas (R1: 29/151, R2: 56/177, R3: 37/167, R4: 54/200 en las primeras camadas analizadas).

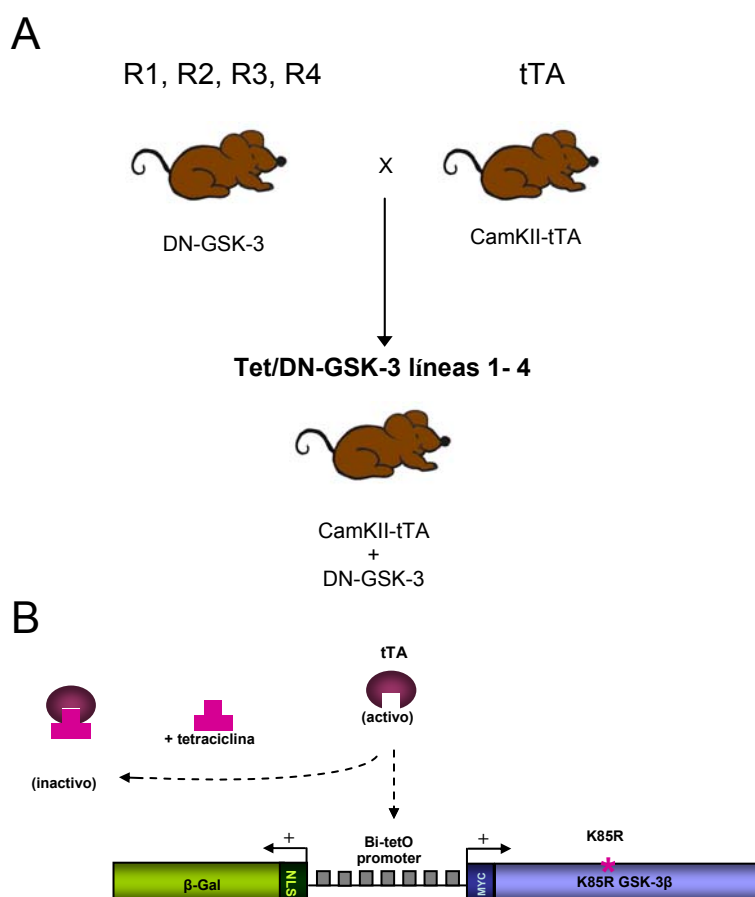


Figura 13. **Generación del ratón condicional Tet/DN-GSK-3.** **A.** Cruce de cada una de las cuatro líneas fundadoras DN-GSK-3 (ratones R1, R2, R3 y R4) con ratones que expresan tTA bajo el promotor de la CamKIIα (ratones tTA). **B.** Esquema del sistema de transactivación regulado por tetraciclina (Sistema Tet-Off)

El patrón de expresión del gen reportero β -gal de las cuatro líneas fue analizado en ratones Tet/DN-GSK-3 de 2 meses de edad por Western blot e inmunohistoquímica (Fig. 14). Los ratones Tet/DN-GSK-3 resultantes de la línea R3 mostraron los niveles más bajos de β -gal por Western blot (Fig. 14). Posteriormente se comprobó, por inmunohistoquímica, que la expresión de la línea R3 se restringía al estriado ventral (datos no mostrados). En cambio, las líneas R1, R2 y R4 revelaron un patrón de expresión de β -gal con una distribución muy similar al patrón endógeno de la CaM-KII α , con expresión evidente en neuronas de corteza, estriado, hipocampo, amígdala y bulbo olfatorio (Fig. 14 y datos no mostrados).

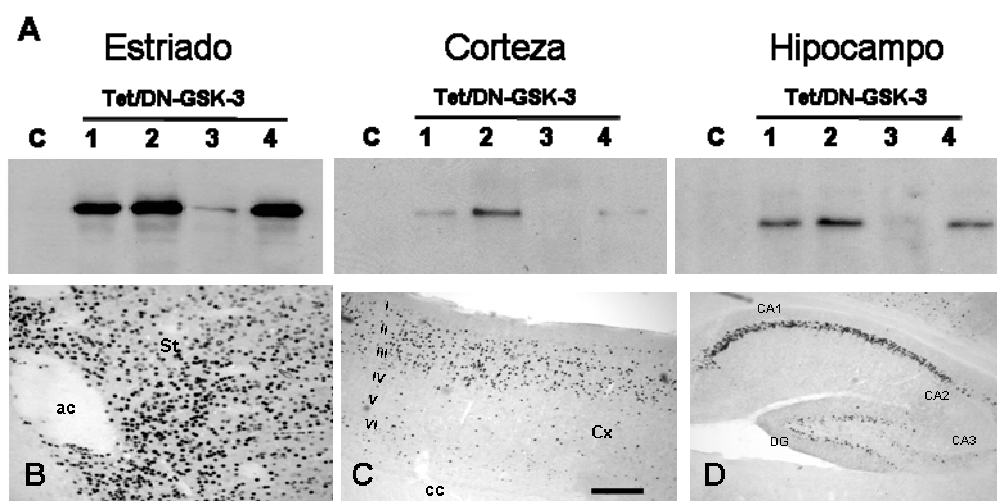


Figura 14. Patrón de expresión transgénica en cerebro anterior de los ratones Tet/DN-GSK-3. A. Detección por Western blot de β -gal en estriado, corteza e hipocampo de ratones Tet/DN-GSK-3 (R1, R2, R3 ó R4) y sus controles de 2 meses de edad. B-D. Inmunohistoquímica de secciones sagitales de cerebros de ratones Tet/DN-GSK-3 (línea 2) en estriado (B), corteza (C) e hipocampo (D). ac, comisura anterior; cc, cuerpo calloso; DG, giro dentado. Barra de escala en C corresponde a 300 μ m en B y C, y a 200 μ m en D.

Puesto que estaba descrito que CaM-KII α se expresa en menor medida en médula espinal (Liang et al., 2004), decidimos explorar también esta estructura, pero no se detectó expresión ni por Western blot ni por inmunohistoquímica o tinción de X-gal (Fig. 15). De acuerdo con lo esperado no se detectó inmunorreactividad en regiones que no presentan expresión de CaM-KII α como cerebelo, tronco del encéfalo, tálamo o tejidos periféricos (Fig. 15). La mayor expresión se detectó en el estriado, donde la mayoría de las neuronas expresaban el transgén (Figs. 14, 15). Por otro lado, en corteza e hipocampo la expresión se ve restringida a ciertas subpoblaciones neuronales (Figs. 14, 15). Más precisamente, en corteza se localiza principalmente en neuronas de capas II-III y en hipocampo predomina en las neuronas de la zona CA1.

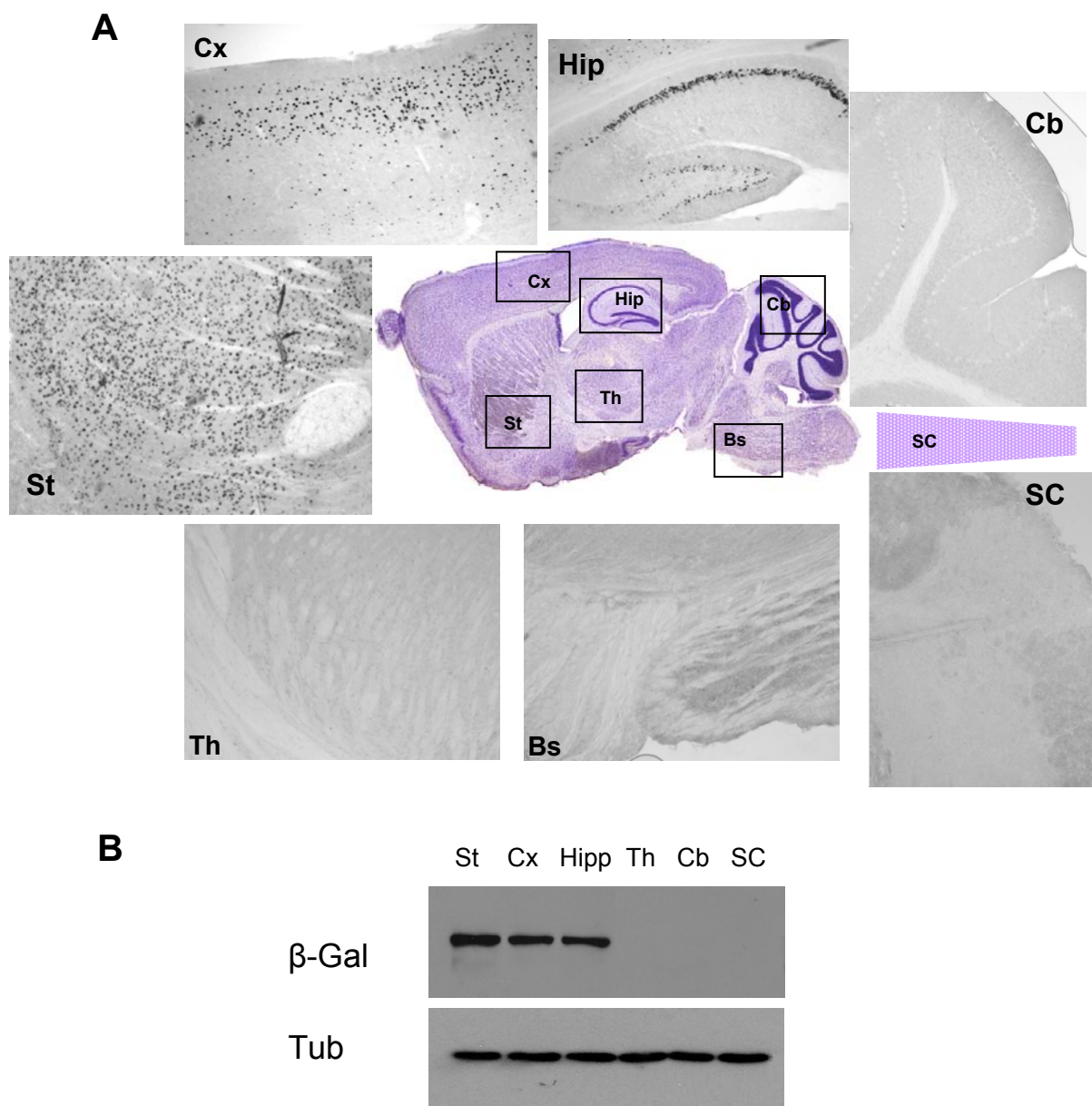


Figura 15. **Ausencia de expresión transgénica fuera del cerebro anterior de los ratones Tet/DN-GSK-3.** **A.** Inmunohistoquímica de secciones sagitales de cerebros de ratones Tet/DN-GSK-3 (línea 2). St, estriado; Cx, corteza; Hipp, hipocampo; Cb, cerebelo; Th, tálamo; Bs, tronco del encéfalo; SC, médula espinal. La imagen central es una tinción con violeta de cresilo tomada del atlas The Mouse Brain (Paxinos and Fanklin, 2001) para la facilitar la localización de las distintas estructuras. **B.** Detección de β -gal por Western blot en estriado, corteza, hipocampo, tálamo, cerebelo y médula espinal de ratones Tet/DN-GSK-3 (línea R2) y sus controles de 2 meses de edad.

En concordancia con los datos obtenidos por inmunohistoquímica, en el análisis por Western blot, el estriado resultó ser la única estructura que presentaba aumento de 1,3 veces ($p < 0,05$) en GSK-3 β total (GSK-3 endógena más transgénica) (Fig. 16). También fue en estriado donde se detectaron neuronas que expresaban el DN-GSK-3,

comprobado por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-myc (datos no mostrados). Teniendo en cuenta que los ratones dobles transgénicos para las líneas R1, R2 y R4 presentaban un patrón y nivel de transactivación similares, las tres líneas fueron analizadas indistintamente. Para todos los estudios bioquímicos, histológicos y de comportamiento, las tres líneas resultaban en fenotipos similares y, en adelante, se nombrarán como Tet/DN-GSK-3 indistintamente.

Los ratones Tet/DN-GSK-3 mostraron un crecimiento normal y no presentaron diferencias en masa corporal respecto de sus controles. Los ratones Tet/DN-GSK-3 también tienen una esperanza de vida normal, y no se encontraron evidencias de formación de tumores, ya sea en examen anatómico somero, o por análisis de la morfología cerebral.

3. Actividad GSK-3 en ratones Tet/DN-GSK-3

Para verificar si la expresión del transgén DN-GSK-3 producía una disminución de actividad GSK-3, se realizaron ensayos de actividad enzimática en estructuras cerebrales homogeneizadas. También se determinó por Western blot el nivel de las formas fosforiladas de GSK-3, así como de su sustrato, tau fosforilado.

Así como el estriado había resultado ser la región con mayor nivel de expresión del transgén, la reducción de la actividad de GSK-3 era más pronunciada en las muestras de estriado de ratones Tet/DN-GSK-3 comparada con la de sus controles (Fig. 16). En cambio, en corteza e hipocampo se observó una tendencia a menor actividad, pero no llegaba a ser estadísticamente significativa (Fig. 16). Como era de esperar, no se observó esta disminución en regiones donde no se expresa el transgén, como el cerebelo.

Se examinaron entonces, por Western blot, los niveles estriatales de las formas inactivas de GSK-3, que resultan de la fosforilación en Ser9 de la isoforma β y en Ser21 de la isoforma α (p-GSK-3) (Fig. 16). Es interesante el hecho de que la expresión del DN-GSK-3 resultaba en un gran aumento (incremento de 3,2 veces, $p < 0.001$) no sólo en p-Ser9-GSK-3 β , sino también en p-Ser21-GSK-3 α . Puesto que los niveles totales de GSK-3 α no se veían alterados en ratones Tet/DN-GSK-3 (datos no mostrados), esto sugiere que significativamente que la reducción observada en la actividad de GSK-3 se debe probablemente al mecanismo de amplificación de la inhibición de GSK-3 reportado anteriormente (Jope, 2003; Zhang et al., 2003). En hipocampo y en corteza se detectó un incremento moderado de p-Ser21/9-GSK-3 por Western blot. Sin embargo, al igual

que en el ensayo de actividad enzimática, al normalizar por los niveles totales de GSK-3, el incremento no llegaba a ser estadísticamente significativo.

De acuerdo con la marcada disminución de actividad GSK-3 en estriado, se encontró que el nivel de tau fosforilado estaba reducido en extractos de tejido derivados de estriado de ratones Tet/DN-GSK-3. Esto fue evidenciado por Western blot con los anticuerpos AT-8 (reducción del 72%, $p < 0.01$) y PHF-1 (reducción del 46%, $p < 0.01$) (Fig. 16), que reconocen dos epítomos fosforilados independientes, que previamente se había descrito que son fosforilados por GSK-3 (Lovestone et al., 1994).

Se analizó también β -catenina, otro sustrato conocido de GSK-3. Puesto que la fosforilación de β -catenina por GSK-3 favorece su degradación por el proteasoma (Aberle et al., 1997), era razonable pensar que sus niveles estarían aumentados en ratones Tet/DN-GSK-3. Sin embargo, como se muestra en la figura 16, los niveles totales de β -catenina no se veían afectados en estos ratones.

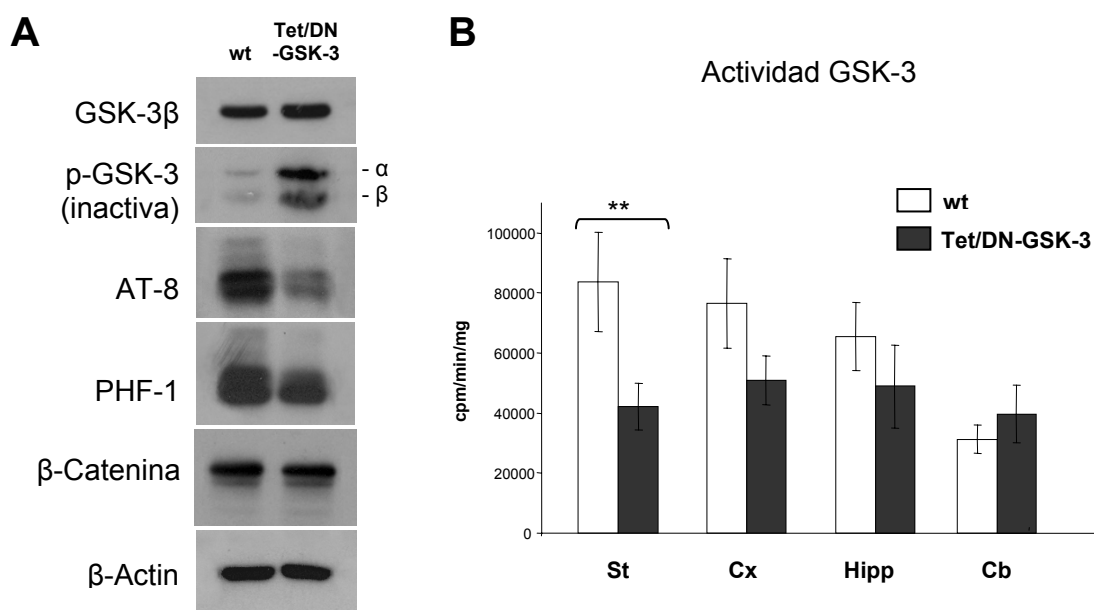
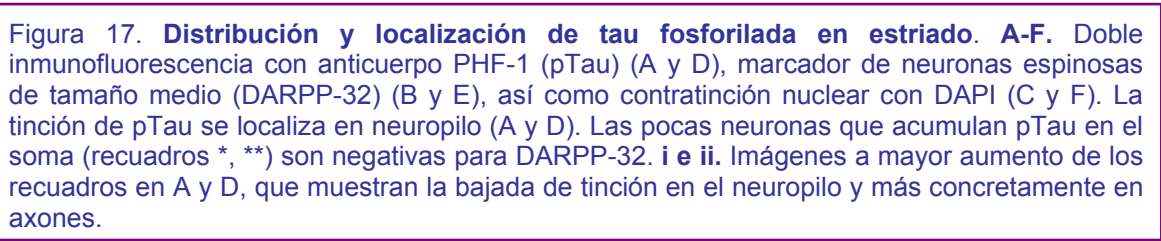


Figura 16. Disminución de la actividad GSK-3 en ratones Tet/DN-GSK-3. A. Detección por Western blot de GSK-3 β , GSK-3 fosforilada (pSer^{21/9} GSK-3 α/β), epítomos de tau fosforilado, AT-8 y PHF-1, y β -catenina en tejido homogeneizado de estriado de ratones Tet/DN-GSK-3 y sus controles (wt). **B.** Ensayo de actividad GSK-3 *in vitro* realizado en estriado, corteza, hipocampo y cerebelo de ratones Tet/DN-GSK-3 y sus controles (wt) (** $p < 0.001$).



parece tener lugar principalmente en los axones de las neuronas espinosas de tamaño medio y también en un subgrupo de interneuronas grandes positivas para ChAT en el estriado.

4. Apoptosis neuronal en los ratones Tet/DN-GSK-3

Puesto que el fenotipo más prominente en el knock-out de GSK-3 β era la apoptosis masiva en células hepáticas (Hoeflich et al., 2000), nos preguntamos si la expresión del transgén DN-GSK-3 en neuronas de ratones Tet/DN-GSK-3 podría producir también apoptosis. Aunque no se detectó atrofia en el cerebro de ratones Tet/DN-GSK-3, en experimentos de inmunofluorescencia se observó que algunas neuronas positivas para myc mostraban el núcleo fragmentado (no mostrado).

Para una exploración cuantitativa de la incidencia de apoptosis en cerebro anterior de ratones Tet/DN-GSK-3, se llevaron a cabo tinción inmunohistoquímica de caspasa-3 activada y tinción de TUNEL. Los ratones Tet/DN-GSK-3 presentaron un mayor número de células positivas para caspasa-3 activada en estriado (Fig. 18). Aunque la disminución de actividad enzimática sólo era significativa en estriado, también se analizó la apoptosis en regiones con una expresión notable del transgén, como corteza e hipocampo, ya que la apoptosis podría estar teniendo lugar en subpoblaciones neuronales específicas que muestran una mayor expresión del transgén y/o que son especialmente vulnerables a apoptosis inducida por una menor actividad GSK-3. De hecho, el número de células positivas para caspasa-3 activa resultó estar aumentado en la corteza de los ratones Tet/DN-GSK-3 (Fig. 18). Como cabía esperar, esto ocurría en las capas externas (Fig. 18), donde se localizan las neuronas que expresan el transgén (Fig. 18). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el número de células positivas para caspasa-3 activa en el hipocampo o en regiones sin expresión del transgén, como el cerebelo (Fig. 18).

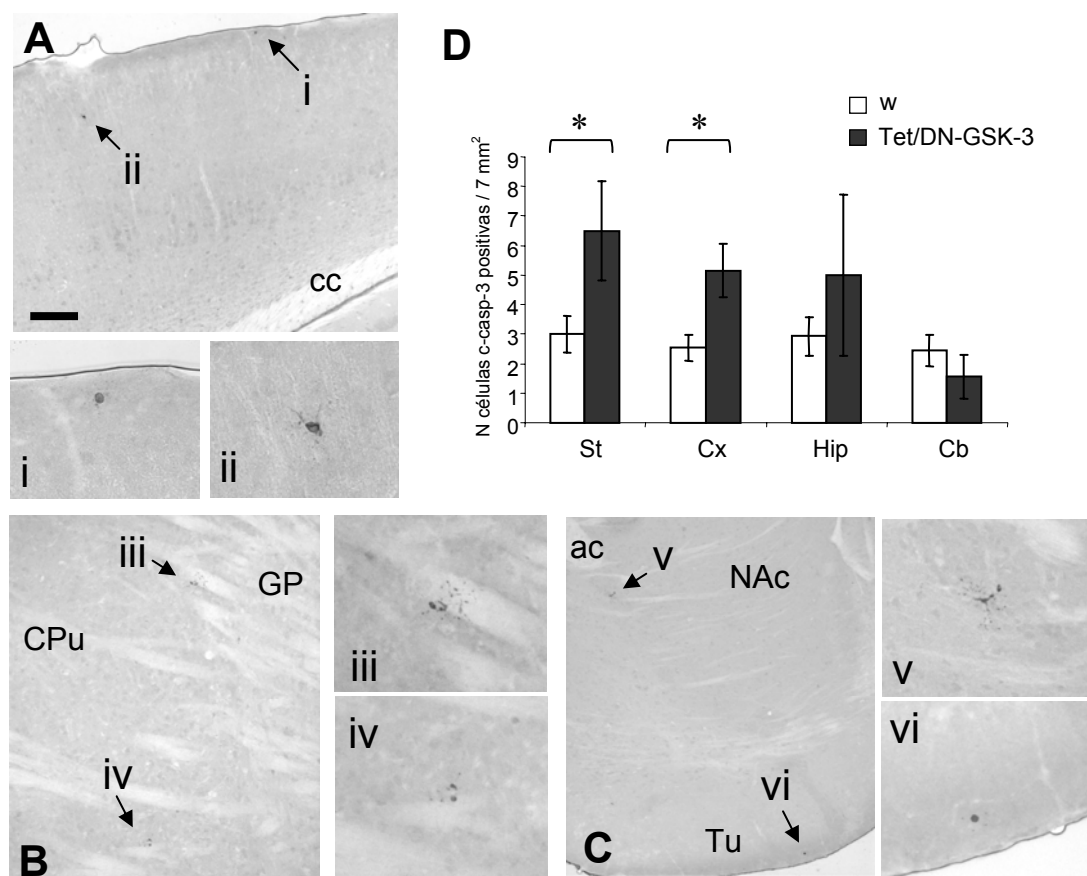


Figura 18. Detección de apoptosis por tinción con caspasa-3 activada. A-C. Inmunohistoquímica con anti-caspasa-3 activada. Imágenes a bajo aumento que muestran células positivas para caspasa-3 activada (flechas) en corteza (A), estriado dorsal (B) y estriado ventral (C) de un ratón Tet/DN-GSK-3. **i-vi.** Imágenes a mayor aumento de las células destacadas en A-C. Escala (A-C)= 200 μ m. **D.** Histograma representando la incidencia de células apoptóticas en estriado, corteza, hipocampo y cerebelo de ratones Tet/DN-GSK-3 y sus controles (wt). Datos representados como media de células positivas \pm error típico por área de 7mm² en una sección de 30 μ m (n=9, * p<0.05).

Por otro lado, los experimentos de doble inmunofluorescencia confirmaron que las células positivas para caspasa-3 activada se detectaban también con anticuerpos anti- β -gal (Fig. 19) y anti-NeuN (no mostrado). Por tanto, se demostraba que las células apoptóticas detectadas eran neuronas que estaban expresando el transgén. Se obtuvieron resultados similares con tinción mediante la técnica de TUNEL (Fig. 19).

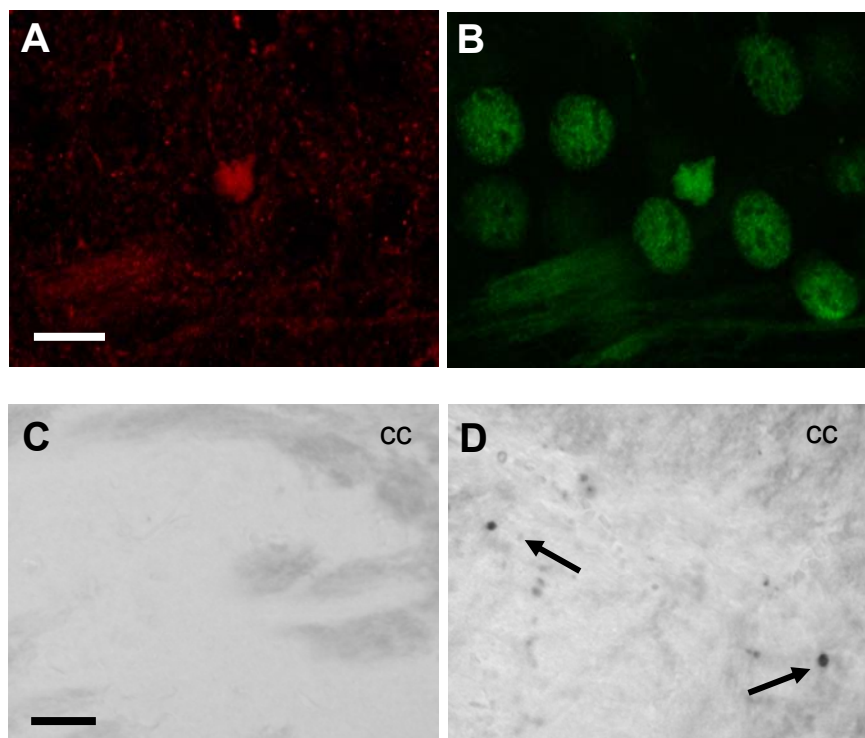


Figura 19. **Detección de apoptosis por inmunofluorescencia y TUNEL.** **A-B.** Doble inmunofluorescencia con anticuerpos anti-caspasa-3 activada (A) y anti β -gal (B) en estriado de un ratón Tet/DN-GSK-3. Barra de escala (A)= 10 μ m en A y B. **C-D.** Tinción de TUNEL en estriado de un ratón wt (C) y un ratón Tet/DN-GSK-3 (D). Barra de escala (C)=80 μ m en C y D. cc, cuerpo calloso.

5. Déficit de coordinación motora en los ratones Tet/DN-GSK-3

El estriado y la corteza, las estructuras cerebrales donde se detectó apoptosis en los ratones Tet/DN-GSK-3, forman parte del circuito de los ganglios basales que está implicado en el control motor. Por esta razón decidimos analizar los ratones en varias pruebas de coordinación motora.

Primero se analizaron los ratones Tet/DN-GSK-3 y sus controles en el aparato Rota-Rod (Fig. 20). Después de entrenar a los ratones a velocidad constante, se programó el aparato para una aceleración de 4 a 40 r.p.m durante 5 minutos y fueron analizados 4 veces a intervalos de 1 hora. Como se muestra en la figura 20, los ratones Tet/DN-GSK-3 presentaron un marcado déficit en las tres primeras pruebas con aceleración. En el promedio de las 4 pruebas sólo el $38.6 \pm 4.6\%$ de los ratones Tet/DN-GSK-3 frente al $58.8 \pm 4.1\%$ de los controles permanecieron en el Rota-Rod cuando éste llegaba a la máxima velocidad (Fig. 20). El tiempo total en el rodillo fue de 262.1 ± 12.2 s para los controles y de 187.66 ± 13.4 s para los ratones Tet/DN-GSK-3 ($p < 0.007$; Fig. 20).

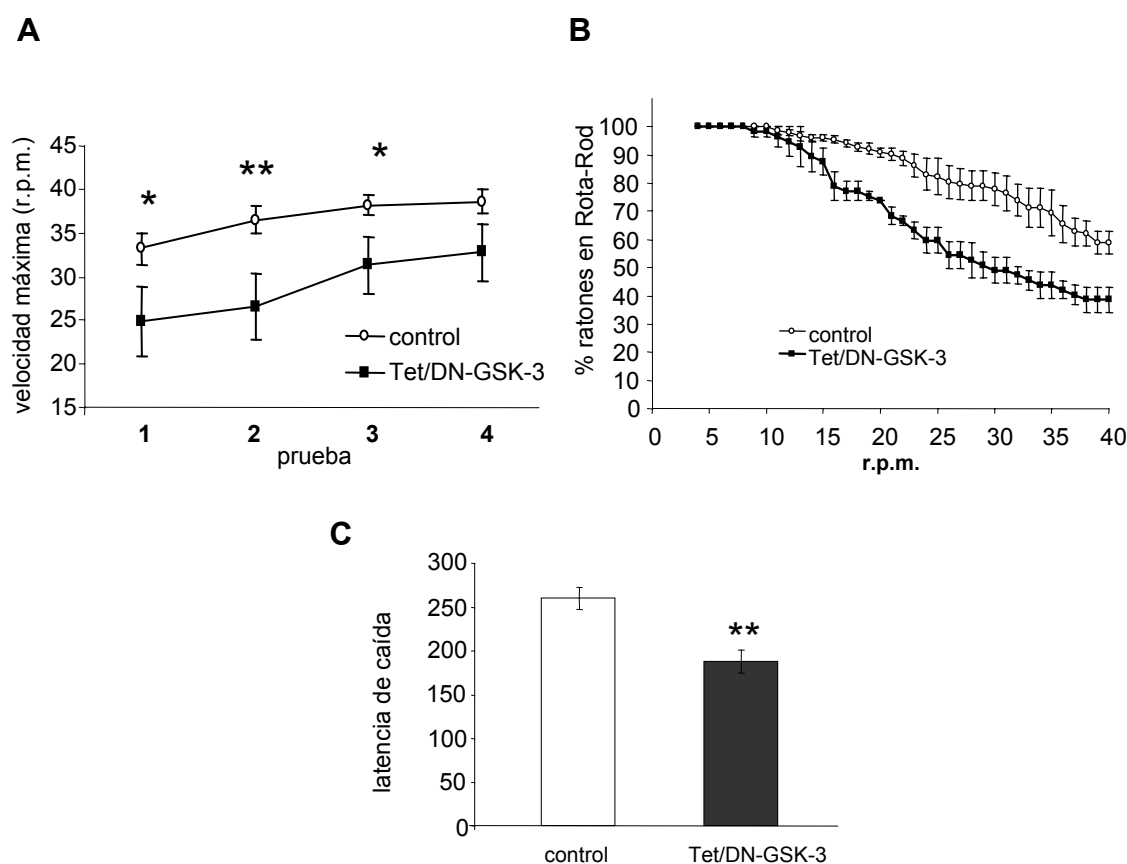


Figura 20. Déficit motor en la prueba de aceleración del Rota-Rod. Las pruebas de coordinación motora fueron realizadas en ratones controles y Tet/DN-GSK-3 de 3 meses de edad. **A.** Desarrollo de las cuatro pruebas de aceleración. **B.** Promedio del porcentaje de ratones que permanecen en el Rota-Rod a medida que acelera. **C.** Histograma que muestra el promedio de latencia de caída en las 4 pruebas \pm error típico (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Estas pruebas se realizaron en dos grupos independientes de ratones, el primero con 19 Tet/DN-GSK-3 y 51 controles y el segundo con 19 Tet/DN-GSK-3 y 34 controles.

El déficit en coordinación motora en ratones Tet/DN-GSK-3 fue confirmado en la prueba de la barra vertical, que mide el tiempo necesario para descender por una barra de superficie rugosa, y que detecta déficits motores dependientes de estriado (Matsuura et al., 1997). Como se muestra en la figura 21, los ratones Tet/DN-GSK-3 requirieron de casi el doble de tiempo para descender por la barra, comparados con los controles (43.15 ± 9.44 s frente a 25.36 ± 3.62 s; $p < 0.03$).

Por otro lado, se realizaron medidas de longitud de zancada en la prueba del patrón de huellas. Los ratones Tet/DN-GSK-3 presentaron una reducción en la longitud de zancada (56.31 ± 0.87 mm vs. 53.17 ± 1.07 mm; $p < 0.03$) y mayor variabilidad en la longitud de la zancada (23.56 ± 1.95 mm vs. 28.82 ± 1.41 mm; $p < 0.02$), confirmando así un déficit motor en estos ratones.

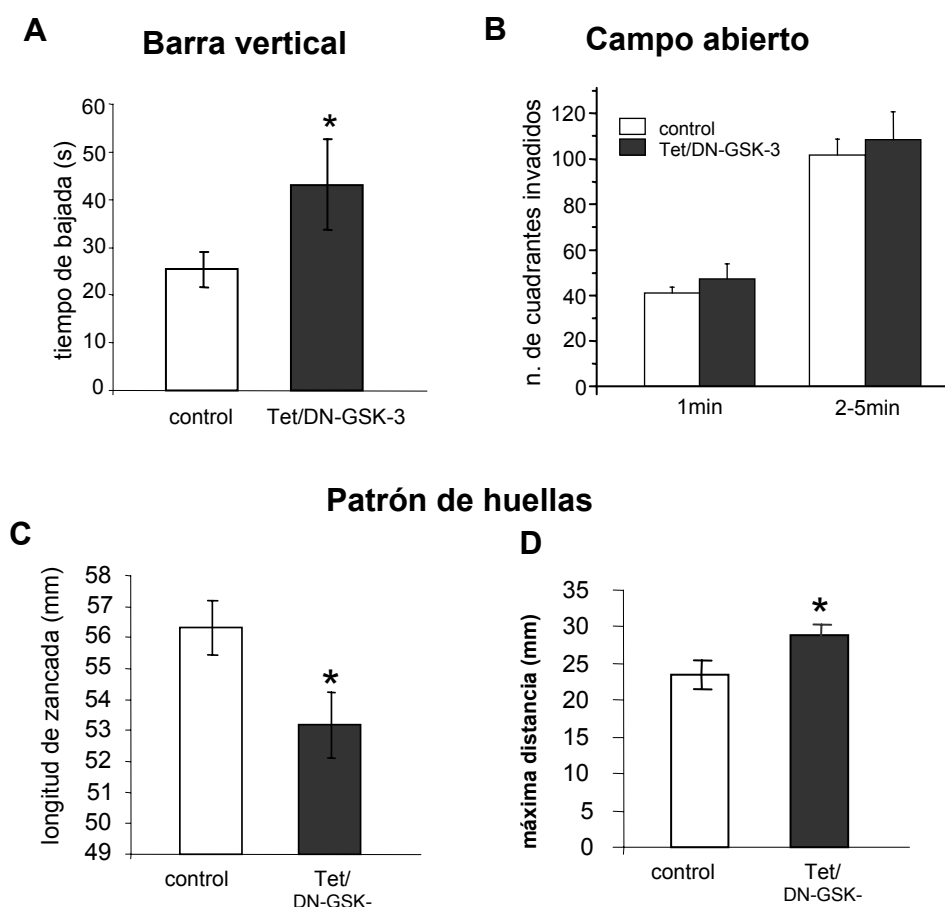


Figura 21. **Déficit motor en la prueba de la barra vertical y en el patrón de huellas.** **A.** Tiempo de bajada de la barra vertical (* $p < 0.03$). **B.** Locomoción en campo abierto. Se contabilizó el número de entradas en los cuadrados durante 5 min. Se analizó por separado el primer minuto para distinguir el efecto de novedad del resto de actividad. **C-D.** Promedio de longitud de zancada (* $p < 0.03$) (C) y máxima variación de longitud de zancada (* $p < 0.02$) (D) en el análisis del patrón de huellas. Estas pruebas se realizaron a 19 Tet/DN-GSK-3 y 34 controles.

Finalmente, para verificar la especificidad de la alteración en coordinación motora, se analizó la actividad motora general de los ratones Tet/DN-GSK-3 en la prueba de campo abierto (Fig. 21). En este caso no se obtuvieron diferencias entre ratones control y Tet/DN-GSK-3, ni durante el primer minuto (efecto de la transferencia) ni durante el resto de la prueba (actividad global).

6. Reducción del comportamiento dependiente de dopamina en los ratones Tet/DN-GSK-3

El déficit motor en los ratones Tet/DN-GSK-3 se podría explicar, al menos en parte, por el aumento en la incidencia de apoptosis en regiones de los ganglios basales, como la corteza y el estriado. Por otro lado, la neurotransmisión por dopamina (DA) del cerebro medio al estriado es clave en determinar la actividad de las neuronas estriatales y, como consecuencia, de la coordinación motora. Curiosamente, se había demostrado recientemente que la actividad GSK-3 estriatal es un mediador importante de la acción de la DA en la función estriatal y en los comportamientos dependientes de ésta (Beaulieu et al., 2004). Por tanto, es posible que la alteración motora detectada, también sea consecuencia de una disminución de la función estriatal y de comportamientos dependientes de DA en los ratones Tet/DN-GSK-3. Para explorar si realmente los ratones Tet/DN-GSK-3 mostraban una menor activación estriatal y menor actividad motora en respuesta a DA, ratones controles y Tet/DN-GSK-3 fueron expuestos a un tratamiento de anfetamina. La anfetamina induce una respuesta de hiperlocomoción, un comportamiento dependiente de dopamina.

Como se muestra en la figura 22, la microdiálisis *in vivo* reveló que la inyección sistémica de anfetamina (2.5 mg/kg, i.p.) inducía un aumento similar de los niveles de DA en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de la anfetamina ($F_{1,15} = 3.76$, $p < 0.00002$), pero no había diferencias entre genotipos o interacción genotipo x tratamiento. El efecto máximo en niveles de dopamina estriatal fue de $224 \pm 41\%$ por encima del nivel basal en ratones controles y de $229 \pm 39\%$ en ratones Tet/DN-GSK-3. Sin embargo, a pesar del grado equivalente de liberación de DA en estriado, el tratamiento con anfetamina que produjo un incremento de la actividad locomotora en los ratones controles, no indujo hiperlocomoción en los ratones transgénicos (Fig. 22)

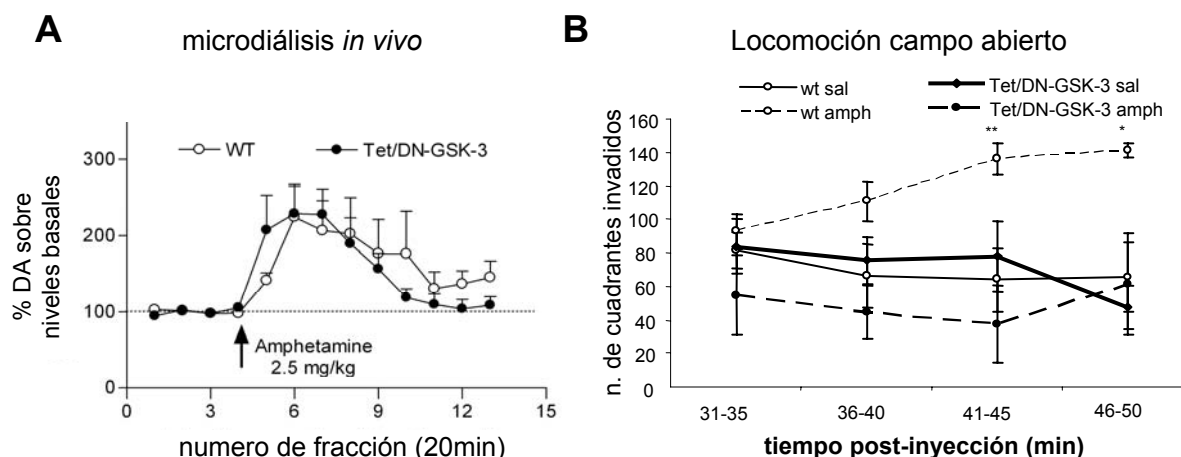


Figura 22. Reducción de la actividad locomotora en respuesta a anfetamina. Se administró anfetamina (2.5 mg/kg, i.p.) para inducir liberación de DA en estriado. **A.** Microdiálisis *in vivo*. Se implantó una sonda de microdiálisis en estriado de ratones control (WT) y Tet/DN-GSK-3 (n=4 y 8, respectivamente). Las fracciones dializadas se recogieron cada 20 min y se determinó la concentración de DA por HPLC. **B.** Locomoción en campo abierto 31-50 min tras inyección i.p. de anfetamina a ratones control y Tet/DN-GSK-3 (controles, n=7 ratones por grupo, Tet/DN-GSK-3, n=4 ratones por grupo).

También se analizó la inducción de c-fos (un marcador de actividad neuronal). La activación de c-fos por anfetamina en estriado resultó notablemente menor en los ratones Tet/DN-GSK-3 (Fig. 23) en concordancia con los resultados de locomoción.

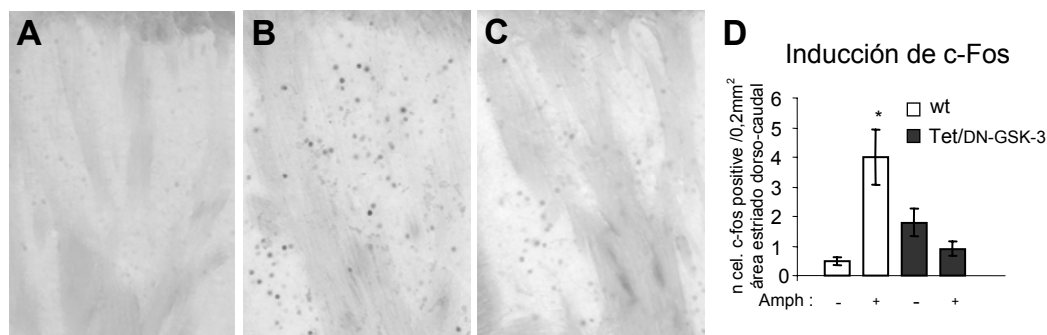


Figura 23. Inducción de c-fos en respuesta a anfetamina. **A-C.** Imágenes representativas de inmunohistoquímica de c-fos en estriado 90 min después de inyección de salino a un ratón control (A) y después de inyección de anfetamina (2.5 mg/kg i.p.) a un ratón control (B) o Tet/DN-GSK-3 (C). **D.** Gráfica que muestra la cuantificación de núcleos inmunoreactivos de c-fos en el estriado de ratones control o Tet/DN-GSK-3 tratados con salino o con anfetamina (* $p < 0.05$).

En resumen, estos resultados indican que el componente dopaminérgico presináptico de la vía nigro-estriatal está intacto en los ratones Tet/DN-GSK-3 y que la reducción de los comportamientos dependientes de dopamina en ratones transgénicos se pueden atribuir a una atenuación de la señalización dopaminérgica postsináptica resultante de la expresión estriatal del DN-GSK-3.

7. Reversión del déficit motor y la muerte neuronal mediante apagado del transgén

Se están desarrollando inhibidores selectivos de GSK-3 para el tratamiento de enfermedades crónicas neurodegenerativas y metabólicas (Cohen and Goedert, 2004). La toxicidad en neuronas adultas de los ganglios basales por expresión del DN-GSK-3, descrita anteriormente, sugiere posibles efectos adversos motores si estos inhibidores se administran a dosis excesivas. Esto nos llevó a explorar si los efectos de apoptosis neuronal y déficit motor eran susceptibles de revertir cuando se apaga el transgén (mediante administración de tetraciclinas) a los ratones Tet/DN-GSK-3 sintomáticos. Para ello, primero se verificó que la administración de doxiciclina produce un apagado efectivo del transgén.

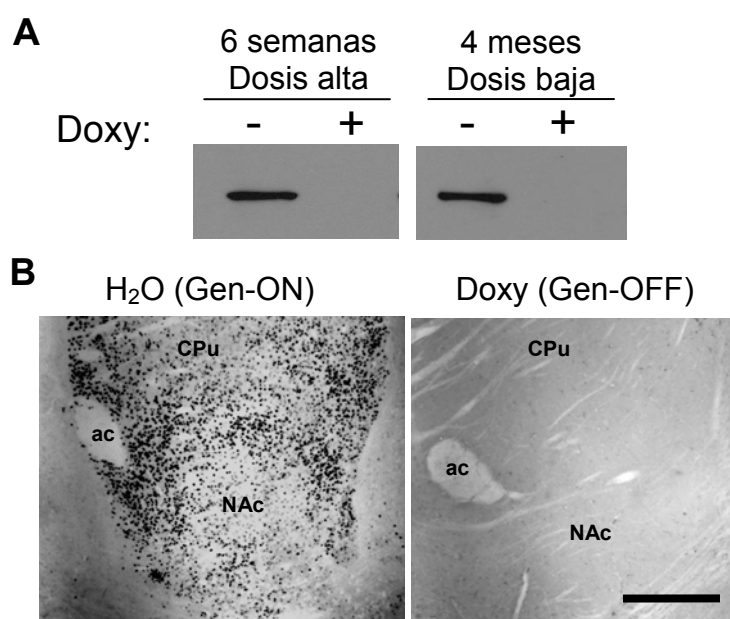


Figura 24. Apagado del transgén por doxiciclina. **A.** Detección por Western blot de β -gal en estriado de ratones Tet/DN-GSK-3 sin tratamiento o tras tratamiento con doxiciclina durante 6 semanas de dosis alta o 4 meses de dosis baja. **B.** Inmunohistoquímica de β -gal en estriado de ratones Tet/DN-GSK-3 sin tratamiento (Gene-On) o tras tratamiento (Gene-Off) con doxiciclina durante 6 semanas de dosis alta. Barra de escala=150 μ m

Como era de esperar, por experiencia previa en el silenciamiento del transgén en ratones condicionales similares (Díaz-Hernández et al., 2005; Engel et al., 2006b; Yamamoto et al., 2000), seis semanas de dosis alta de doxiciclina (2mg/ml en agua de bebida) o cuatro meses a dosis baja (0.5mg/ml) resultó en niveles indetectables de

expresión del gen reportero, β -gal, en ratones Tet/DN-GSK-3 tratados con doxiciclina (Gene-Off) (Fig. 24). De igual forma, los niveles GSK-3 β y p-GSK-3 ya no estaban por encima de los de sus respectivos controles (datos no mostrados).

Se analizó entonces, si la actividad GSK-3 era susceptible de volver a los niveles normales tras administración de doxiciclina. Para esto, homogeneizados de estriado de ratones Tet/DN-GSK-3 no tratados (Gene-On) y tratados (Gene-Off) y sus respectivos controles fueron utilizados para el ensayo enzimático *in vitro* de GSK-3. Como se muestra en la figura 25, los ratones Tet/DN-GSK-3 (Gene-Off) mostraron un aumento significativo de actividad GSK-3 con respecto a los ratones Tet/DN-GSK-3 (Gene-On) y eran indistinguibles de los ratones no transgénicos. Esto demuestra que el restablecimiento de niveles normales de la proteína, también resulta en normalización de la actividad GSK-3.

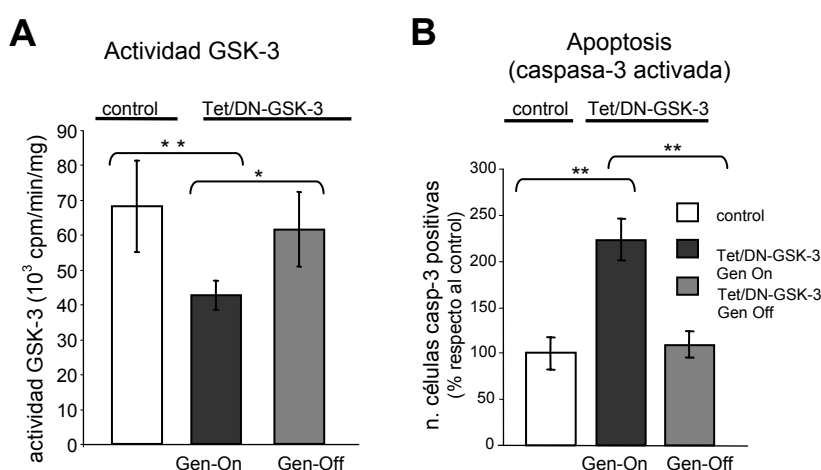


Figura 25. Análisis bioquímico tras administración de doxiciclina. A. Ensayo enzimático de actividad GSK-3 en homogeneizados de estriado (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$). **B.** Detección inmunohistoquímica de células caspasa-3 positivas en el estriado. Se cuantificaron secciones de 30 μ m (4 secciones por animal) de ratones Tet/DN-GSK-3 Gene-On ó Gene-Off y se normalizaron respecto a su control (** $p < 0.001$).

Finalmente se exploró la posible recuperación del fenotipo motor en los ratones Tet/DN-GSK-3. Según se muestra en la figura 26, los ratones Tet/DN-GSK-3, a los 3 meses de edad, mostraban el déficit motor en Rota-Rod previamente descrito. Tras el primer análisis, se dividieron los ratones Tet/DN-GSK-3 y sus controles en dos grupos. Un grupo se mantuvo sin ningún tratamiento farmacológico y al otro grupo se le administró el paradigma de dosis baja de doxiciclina, que había resultado anteriormente eficiente en el apagado del transgén, pero sin afectar a la realización de las pruebas de Rota-rod en los ratones control (Díaz-Hernandez et al., 2005). Ratones Tet/DN-GSK-3

no tratados (Gene-On) y tratados (Gene-Off), así como sus respectivos controles, fueron analizados nuevamente cada mes en la prueba de aceleración del Rota-rod. A pesar de una tendencia a la mejora en la coordinación en Rota-rod a lo largo de 1, 2 o 3 meses de tratamiento con doxiciclina, dicha mejora no llegaba a ser estadísticamente significativa (datos no mostrados). Sin embargo, como se observa en la figura 26, después de 4 meses de tratamiento los ratones Tet/DN-GSK-3(Gene-Off) presentaban una mejora significativa en la realización de la prueba de Rota-Rod respecto de los Tet/DN-GSK-3 (Gene-On) y eran indistinguibles de los ratones controles.

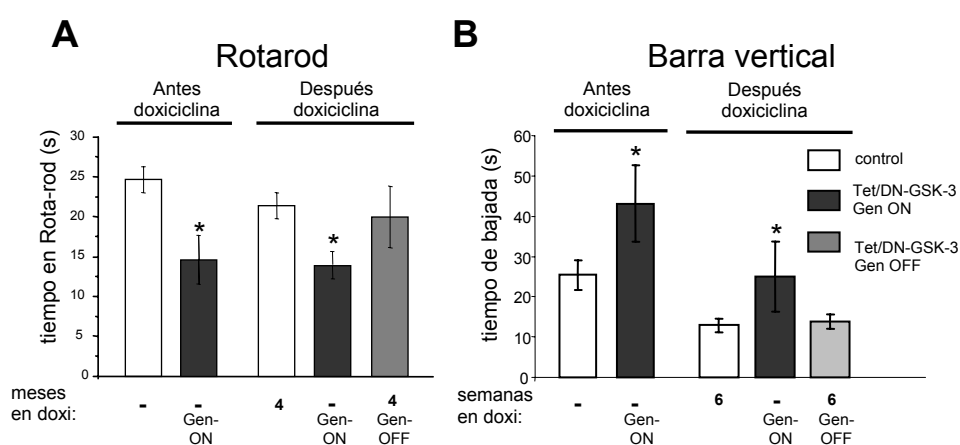


Figura 26. Reversión del fenotipo motor tras administración de doxiciclina. **A.** Prueba de aceleración en Rota-Rod de ratones control y Tet/DN-GSK-3 a la edad de 3 meses sin tratamiento farmacológico y a la edad de 7 meses tras 4 meses de doxiciclina a dosis baja (* $p<0,01$). **B.** Tiempo de descenso de la barra vertical de ratones control y Tet/DN-GSK-3 a la edad de 3 meses sin tratamiento farmacológico y a la edad de 4.5 meses después de 6 semanas de tratamiento con doxiciclina 2mg/ml (* $p<0,01$). Estas pruebas se realizaron en 19 Tet/DN-GSK-3 y 34 controles (antes de doxiciclina), posteriormente se dividió cada grupo en dos subgrupos iguales, uno recibió agua y otro, agua con doxiciclina.

De forma similar, el tratamiento de 2mg/ml de doxiciclina durante 6 semanas también resultó en una reversión del fenotipo observado en el descenso de la barra vertical. Igualmente, la media de la longitud de zancada entre ratones Tet/DN-GSK-3 no tratados y tratados ya no era significativamente distinta (Fig. 26 y datos no mostrados). Estos resultados sugieren que los potenciales efectos secundarios a nivel motor producidos por una inhibición farmacológica excesiva de GSK-3 podrían ser susceptibles de reversión.

EFFECTOS NEUROLÓGICOS DE LA INHIBICIÓN CRÓNICA DE GSK-3 MEDIANTE ABORDAJE FARMACOLÓGICO

8. Paradigma de administración crónica de litio

Con el fin de explorar las consecuencias negativas de la administración crónica de litio en ratones, primero se estableció un protocolo de administración de LiCl en el pienso de comida que diera lugar a litemias dentro del rango superior de la ventana terapéutica para el tratamiento y profilaxis del trastorno bipolar, es decir entre 1,0 y 1,4mM (Macritchie, 2004).

Para conseguir esto, se incrementó gradualmente la dosis de litio durante un periodo de ocho semanas (Fig. 27). En concordancia con observaciones previas de nuestro grupo (Engel et al., 2006a), la alimentación de los ratones con un pienso que contenía 1,7 g de LiCl/Kg durante dos semanas dio lugar a una concentración de litio en suero de $0,64 \pm 0,04$ mM (Fig. 27). Posteriormente, los ratones fueron alimentados con una preparación que contenía 2,55 g de LiCl/Kg durante 6 semanas a lo largo de las cuales las litemias fueron controladas semanalmente. Como se muestra en la Fig. 27, los niveles de litio en suero estuvieron por encima de 1,0 mM ya a la tercera semana e incrementaron progresivamente durante las tres semanas sucesivas, alcanzando un estado estacionario de 1,2 mM. Una vez completadas estas ocho semanas de administración de litio, los ratones fueron sometidos a pruebas de comportamiento motor y a análisis bioquímicos.

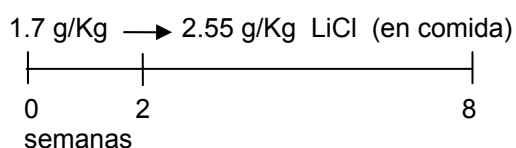
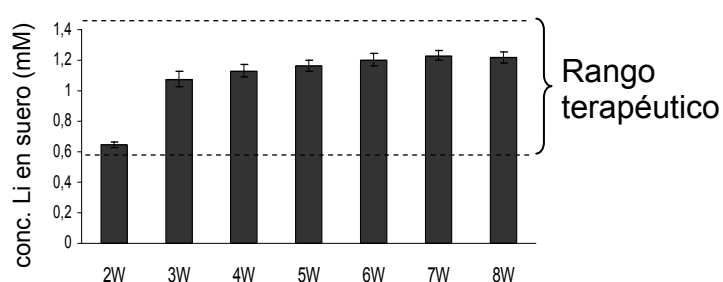
A Protocolo de administración de litio**B** Niveles de litio en plasma

Figura 27. **Paradigma de administración de litio.** **A.** Dosis de litio administradas a ratones salvajes. **B.** Concentraciones de litio en suero obtenidas semanalmente durante el tratamiento.

9. Actividad GSK-3 y coordinación motora en ratones tratados crónicamente con litio

Primero se comprobó que la administración de litio había dado lugar a una disminución de la actividad de GSK-3 en el cerebro (Fig. 28). El análisis por Western blot de los homogeneizados de cerebro de ratones control y tratados con litio se realizó empleando anticuerpos que reconocen a la GSK-3 inactiva (fosforilada en serina) y anticuerpos que reconocen a la GSK-3 independientemente de su estado de fosforilación. De acuerdo con resultados previos de administración de litio *in vivo* (Noble et al., 2005), se observó un incremento dramático de GSK-3 inactiva en los homogeneizados de cerebro de los ratones tratados con litio (Fig. 28).

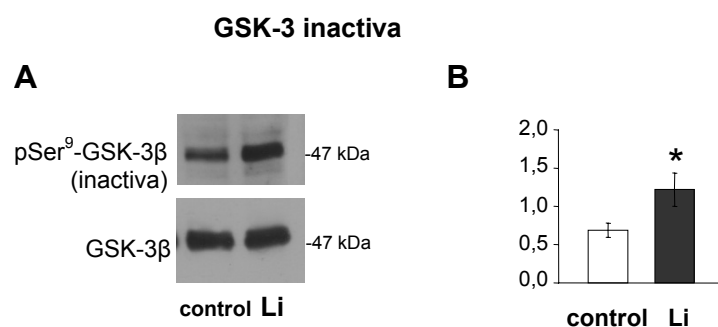


Figura 28. Disminución de la actividad GSK-3 tras administración de litio. A. Detección por Western blot de GSK-3 β fosforilada en Ser9 y niveles totales de GSK-3 β en homogeneizado de estriado de ratones tratados con litio y sus controles. **B.** Cuantificación del ratio pGSK-3/GSK-3 de las bandas mostradas en A (* $p < 0,05$).

Como se ha descrito anteriormente, el ratón transgénico con menor actividad de GSK-3 (Tet/DN-GSK-3), realiza peor las tareas motoras dependientes del estriado, como el descenso de la barra vertical o, simplemente, el modo de andar. Se analizó el comportamiento motor en ratones controles a los que se había administrado litio según el paradigma anteriormente descrito. Los ratones tratados con litio desarrollaron una locomoción espontánea normal en campo abierto (datos no mostrados). Sin embargo, de forma similar a los ratones Tet/DN-GSK-3, cuando se midió la coordinación motora en la barra vertical, los ratones tratados con litio estuvieron en total el doble de tiempo en la barra comparado con los ratones controles (62.90 ± 9.60 s vs 31.19 ± 4.81 s; $p = 0.014$). Más aún, el tiempo real de descenso fue también un 61,2% mayor en los ratones tratados con litio (22.80 ± 3.40 s vs 13.97 ± 2.44 s; $p < 0.005$) (Fig. 29). En la línea de estas observaciones, los ratones tratados mostraron anomalías en el modo de andar, puesto en evidencia en parámetros como la longitud de la zancada, en la que los ratones tratados muestran una reducción, o en variabilidad de medidas como la longitud de zancada o el ángulo de pisada (Fig. 29) medidos con el aparato digital “Digigait”.

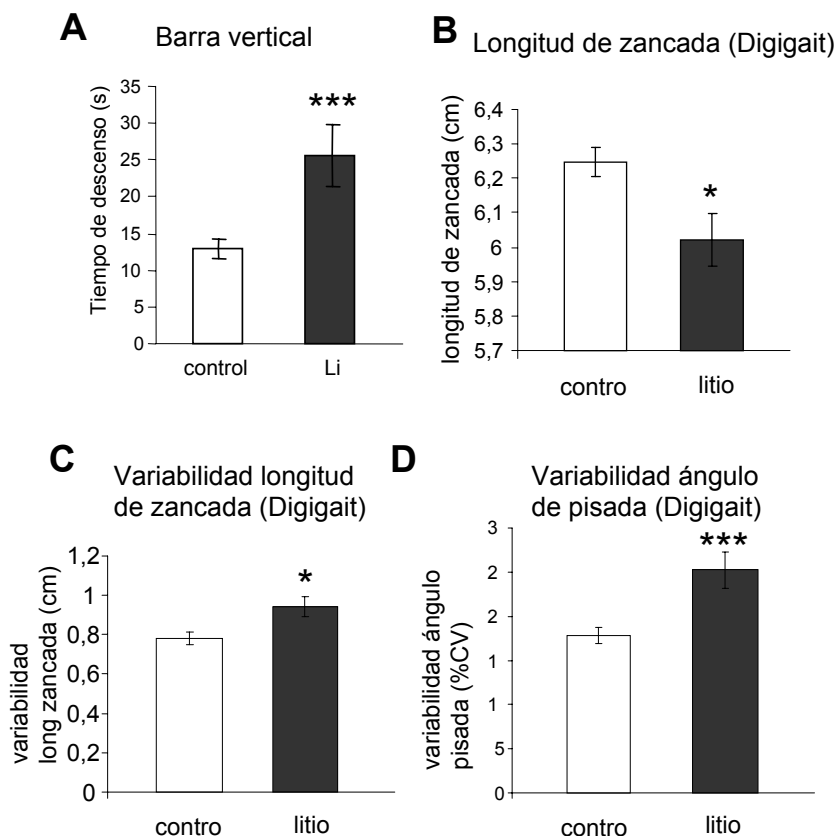


Figura 29. **Déficit en coordinación motora tras administración de litio.** **A.** Tiempo de descenso de la barra vertical (***) $p < 0.001$; control, $n=21$; litio, $n=24$). **B.** Longitud de zancada en el análisis del modo de andar medido con el sistema Digigait. **C.** Variabilidad en la longitud de zancada. **D.** Variabilidad en el ángulo de pisada (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; control, $n=16$; litio, $n=13$).

Se puede concluir, por tanto, que los ratones con litemias dentro del rango terapéutico elevado del tratamiento del trastorno bipolar muestran una actividad de GSK-3 disminuida en el cerebro, acompañada de sutiles efectos secundarios motores en concordancia con los efectos que experimentan frecuentemente los pacientes tratados crónicamente con litio, tales como el temblor de manos.

10. Efecto tóxico del tratamiento crónico de ratones con litio

Se comprobó si la administración de litio, además de disminuir la actividad de GSK-3 y causar déficits en la coordinación motora, también inducía apoptosis neuronal en regiones implicadas en el control motor. Para ello, se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo que reconoce a la enzima caspasa-3 activada. Como se puede observar en la figura 30, la mayoría de las regiones cerebrales analizadas

de los ratones tratados con litio mostraron un incremento en el número de células apoptóticas en comparación con los controles.

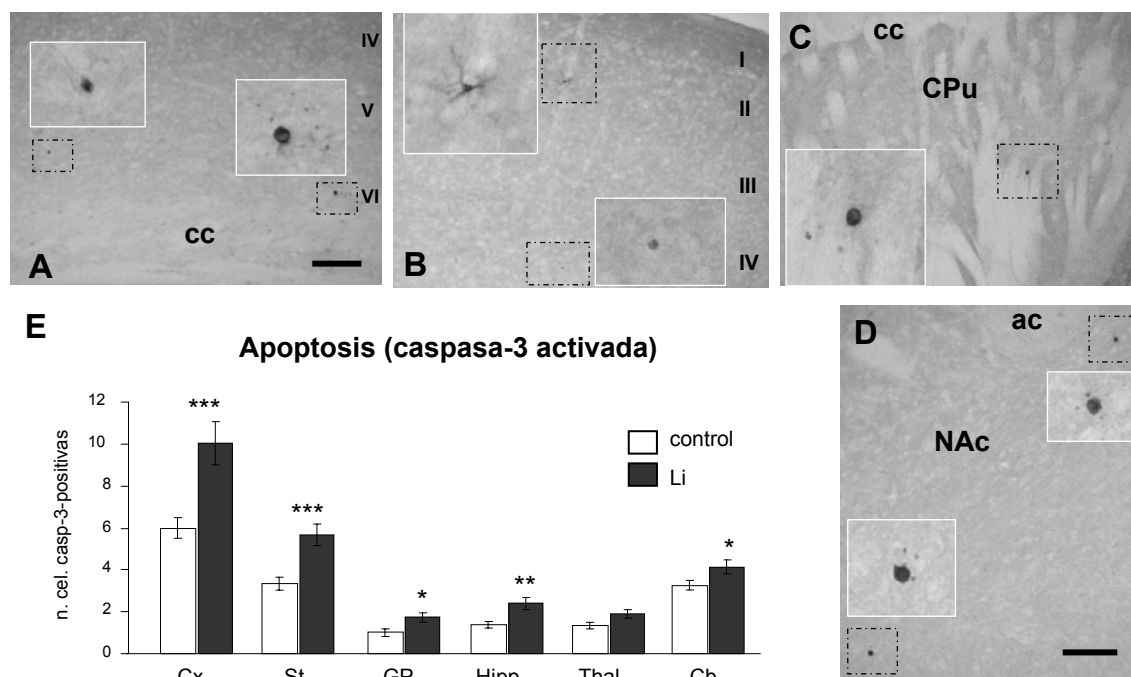


Figura 30. Apoptosis neuronal inducida por litio crónico. A-D. Detección de las células positivas para caspasa-3 activada en corteza (A,B) y estriado (C,D) de un ratón tratado con litio. (A) Capas profundas (IV-VI) de la corteza, (B) capas superiores (I-IV) de la corteza, (C) estriado dorsal, (D) estriado ventral. Los recuadros blancos muestran mayor aumento de las zonas punteadas. cc, cuerpo caloso; Cpu, caudado putamen; NAc, núcleo accumbens; ac, comisura anterior. Barra de escala en (A) y (D) corresponden a 200 μ m in (A-D). E. Histograma que muestra la cuantificación del número de células caspasa-3 positivas por sección sagital de 30 μ m en las diferentes regiones analizadas (n=21 por grupo, 4 secciones/animal). Cx, corteza; St, estriado; GP, globo pálido; Hipp, hipocampo; Thal, tálamo; Cb, cerebelo. (* $p < 0,03$, ** $p < 0,003$, *** $p < 0,001$).

Entre las regiones analizadas, se detectó un aumento en el número de células positivas para caspasa-3 en corteza, estriado, globo pálido, hipocampo y cerebelo (Fig. 30). En cambio, amígdala, tálamo y colículo superior no mostraron diferencias significativas (Fig. 30 y datos no mostrados). El incremento fue más significativo en corteza y en estriado, que mostraron un incremento de 1,8 y 1,92 veces, respectivamente, en el número de células apoptóticas en comparación con los controles (Fig. 30). La identidad neuronal de la mayoría de las células positivas para caspasa-3 en los ratones tratados con litio fue confirmada por doble inmunofluorescencia con un marcador neuronal, NeuN (Fig. 31). Estos análisis mostraron un porcentaje de células caspasa-3 positivas marcadas con NeuN del 80%.

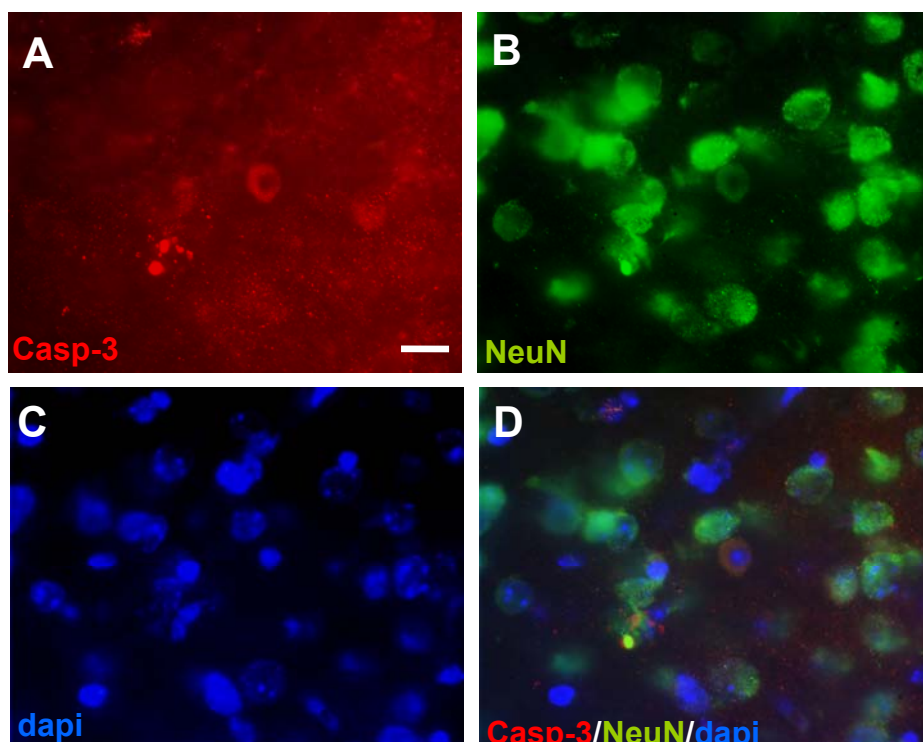


Figura 31. **Identidad neuronal de la mayoría de las células apoptóticas.** A-D Doble inmunofluorescencia con anti-caspasa-3 activada (A), anti-NeuN (B), dapi (C) y mezcla de los tres (D) en una sección estriatal de un ratón tratado con litio. Barra de escala en A corresponde a 10 μ m en A y B.

Se puede concluir, por tanto, que litemias con un rango de 1-1,2 mM dan lugar a una muerte neuronal apoptótica en múltiples regiones cerebrales. Curiosamente, de acuerdo con los efectos motores ya descritos, las regiones cerebrales vulnerables se corresponden con los ganglios basales involucrados en la coordinación motora fina, cuya disfunción en humanos da lugar, usualmente, a temblor (Deuschl et al., 2000).

11. Translocación nuclear del factor de transcripción NFAT por litio

A continuación, se estudió el mecanismo potencial por el cual el tratamiento crónico con litio y la inhibición concomitante de GSK-3 da lugar a apoptosis neuronal. Existe abundante literatura ejemplificando el papel dual de la inhibición de GSK-3 en la modulación de la apoptosis (Beurel and Joje, 2006). Se ha visto que la inhibición de GSK-3 previene la muerte celular inducida por múltiples estímulos apoptóticos tales como privación de factores de crecimiento, daño del ADN, toxicidad por glutamato y muchas otras (Beurel and Joje, 2006). Por el contrario, cuando la apoptosis se lleva a

cabo por la activación de los receptores conteniendo dominios de muerte tales como Fas o el receptor TNF (por ejemplo, cuando tiene lugar por la vía extrínseca de apoptosis (Ashkenazi and Dixit, 1998)), la inhibición de GSK-3 potencia el efecto apoptótico. Esto se puso de manifiesto porque el litio induce toxicidad mediada por TNF en las células tumorales del ratón (Beyaert et al., 1989). Además se vio que ratones mutantes nulos de GSK-3 β morían en estado embrionario, debido a una mayor apoptosis mediada por TNF en el hígado (Hoeflich et al., 2000). Este efecto proapoptótico de la inhibición de GSK-3 fue posteriormente extendida a otros ligandos de receptores que contienen dominios de muerte, tales como TRAIL (Liao et al., 2003; Rottmann et al., 2005). Finalmente, en relación con las neuronas, se encontró que la apoptosis inducida por la activación del receptor Fas también estaba potenciada por varios inhibidores GSK-3, incluyendo el litio (Song et al., 2004).

Con estos antecedentes, se buscó una posible relación entre la inhibición de GSK-3 y la estimulación de la vía extrínseca de la apoptosis. Curiosamente, había sido reportado que la inhibición de GSK-3 promueve la translocación nuclear de la familia de factores de transcripción NFATc en varios tipos celulares (Beals et al., 1997a; Beals et al., 1997b) incluyendo los cultivos primarios de neuronas (Graef et al., 1999). Otros estudios demuestran que la regulación de la expresión de FasL es dependiente de NFAT (Rengarajan, 2000). Para estudiar el mecanismo por el cual la administración crónica de litio da lugar a apoptosis, nos planteamos la siguiente hipótesis (Fig. 32): primero la inhibición de GSK-3 por administración de litio crónico, daría lugar a la translocación nuclear de la familia de factores de transcripción NFAT y al consecuente aumento de la producción de FasL. Después, se produciría la activación de los receptores Fas, que iniciarían la apoptosis a través de la vía extrínseca. Para explorar esta hipótesis se realizaron los siguientes experimentos.

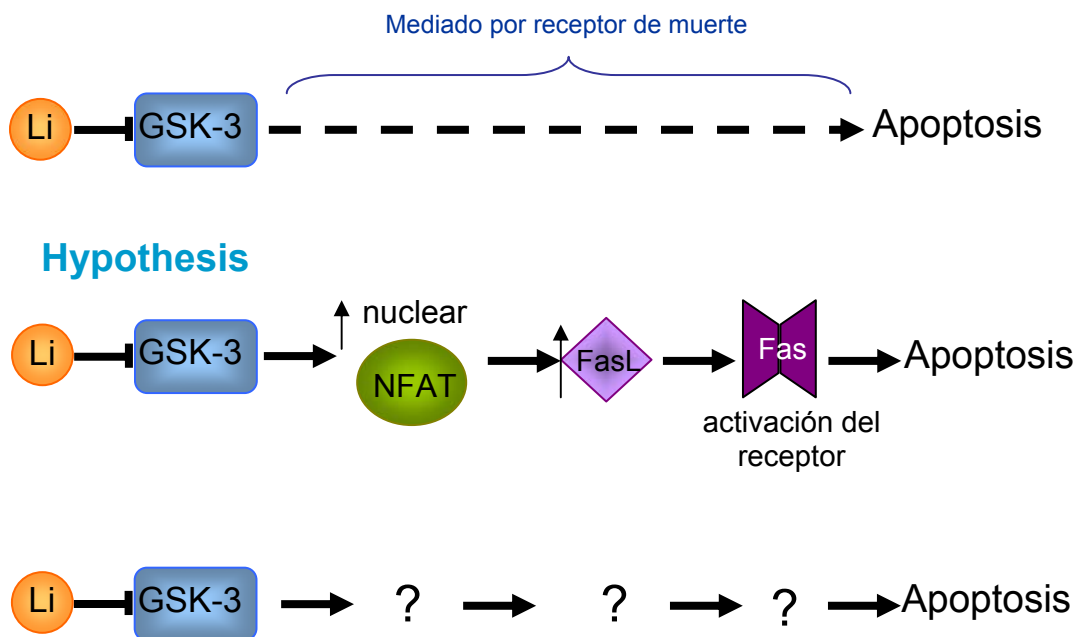


Figura 32. **Hipótesis del mecanismo de apoptosis en tratamiento crónico con litio**

De entre los miembros de la familia NFAT, ha sido reportado que NFATc3 y NFATc4 se expresan en neuronas (Graef et al., 1999; Graef et al., 2003; Jayanthi et al., 2005). Para ver si la administración crónica de litio da lugar a la translocación nuclear de estos factores de transcripción en neuronas, se llevó a cabo una inmunofluorescencia con anticuerpos anti- NFATc3 (no mostrado) y anti- NFATc4 (Fig. 33) y el marcador de núcleos de neuronas, NeuN.

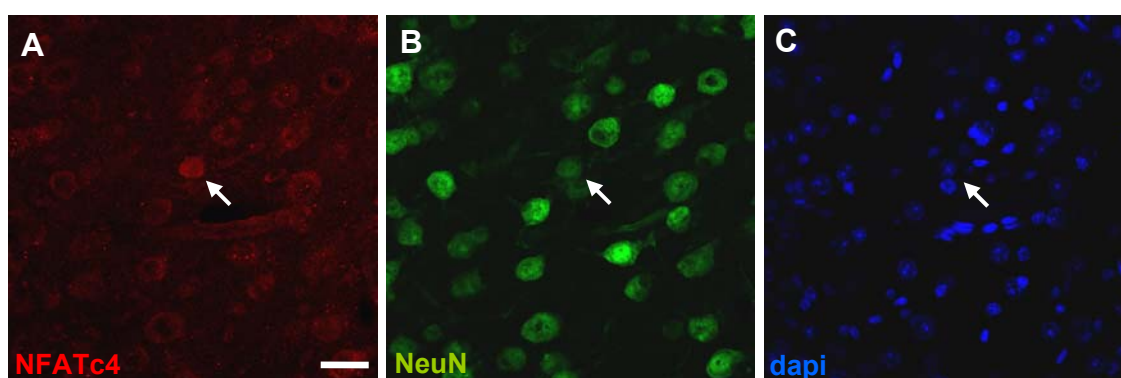


Figura 33. **Detección de la translocación nuclear de NFATc4 por inmunofluorescencia. A-C.** Doble inmunofluorescencia con anti-NFATc4 (A), anti-NeuN (B) y dapi (C) en estriado de un ratón tratado con litio. Barra de escala en A corresponde a 10 μ m en A y B.

El análisis de la inmunofluorescencia, realizado con un microscopio confocal, permitió verificar que existe una translocación nuclear en determinadas neuronas, fácilmente distinguible al microscopio, y que colocaliza con el marcador neuronal, NeuN, así como con la tinción nuclear obtenida con dapi. En este análisis también se pudo observar que prácticamente la totalidad de las células marcadas con el anticuerpo NFATc4 (Fig. 33) o con el anticuerpo NFATc3 (no mostrado), eran neuronas.

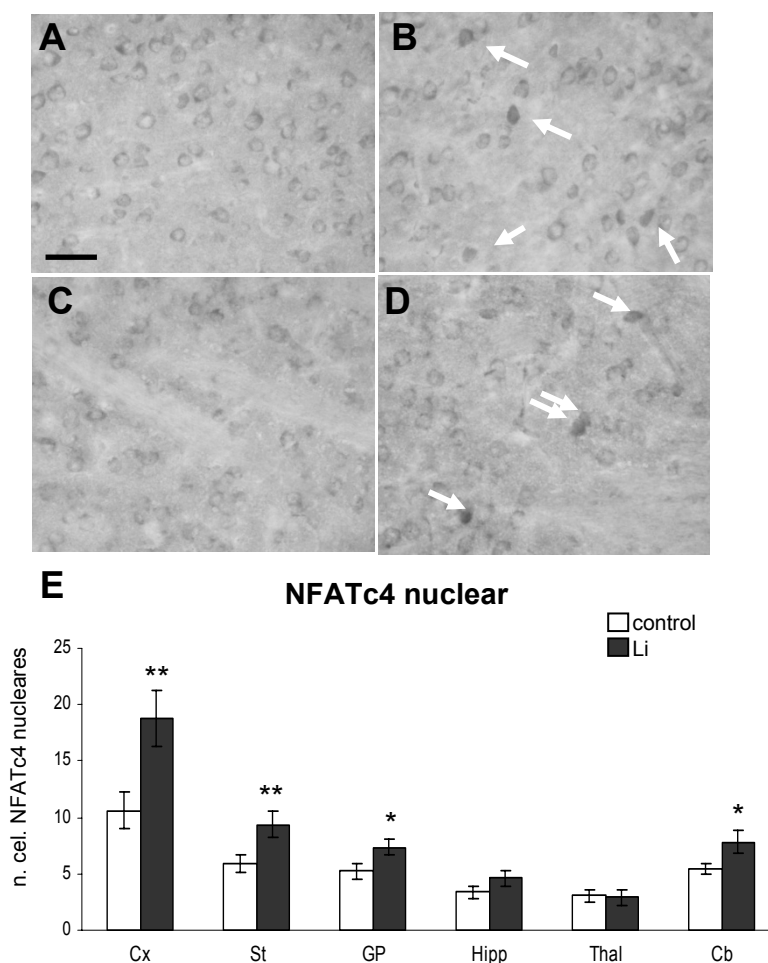


Figura 34. **Aumento de la localización nuclear del factor de transcripción NFATc4 en ratones tratados con litio.** A-D. Inmunohistoquímica de NFATc4 en Cx (A y B) y St (C y D) de ratones control (A y C) y tratados con litio (B y D). Las flechas en B y D apuntan a neuronas con tinción nuclear de NFATc4. Barra de escala en A corresponde a 100 µm en (A-D). E. Histograma que muestra el número de neuronas con tinción nuclear de NFATc4 por sección de 30 µm en las diferentes regiones analizadas (n=16 por grupo, 1 sección/animal). Cx, corteza; St, estriado; GP, globo pálido; Hipp, hipocampo; Thal, tálamo; Cb, cerebelo. (*p<0,03, **p<0,01).

Aunque ambos anticuerpos tiñeron las neuronas en todas las áreas cerebrales analizadas, el número de neuronas positivas para NFATc4 fue superior al número de neuronas positivas para NFATc3 (como se compara en los paneles A-D en la figura 34 frente a los paneles A-B, en la figura 35). En los ratones no tratados, la gran mayoría de las neuronas mostraron sólo una tinción citoplásmica con ambos anticuerpos (Fig. 34 y datos no mostrados). Sin embargo, el tratamiento con litio da lugar a un dramático incremento del número de neuronas con tinción nuclear tanto con el anticuerpo anti-NFATc4 (Fig. 34) como con el anticuerpo anti-NFATc3 (Fig. 35).

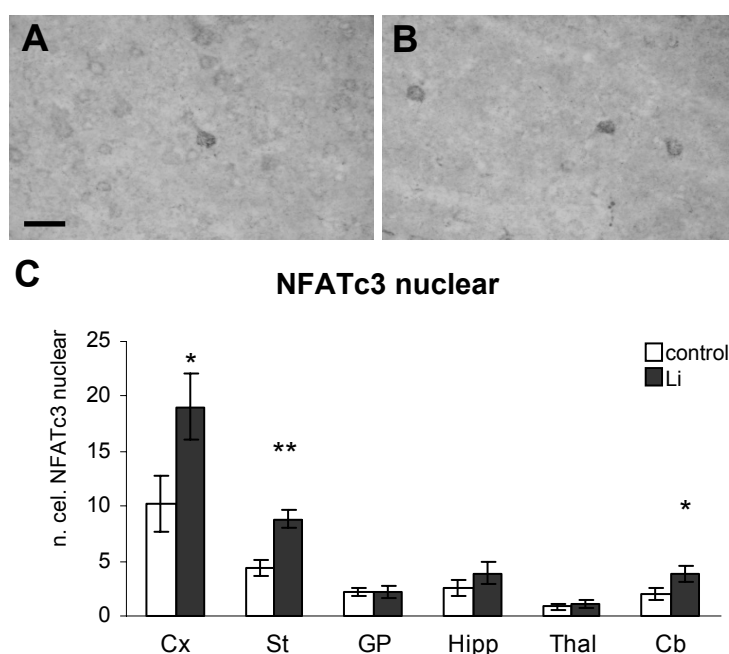


Figura 35. Aumento de la localización nuclear del factor de transcripción NFATc3 en ratones tratados con litio. A-B. Inmunohistoquímica de NFATc3 en Cx (A) y St (B) de ratones tratados con litio. C. Histograma que muestra el número de neuronas con tinción nuclear de NFATc3 por sección de 30 μ m en las diferentes regiones analizadas (n=16 por grupo, 1 sección/animal). Cx, corteza; St, estriado; GP, globo pálido; Hipp, hipocampo; Thal, tálamo; Cb, cerebelo. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Estos resultados concuerdan con datos reportados anteriormente, que mostraban un aumento de los niveles de NFATc4 nuclear como consecuencia de un descenso de la actividad GSK-3 en cultivos de neuronas (Graef et al., 1999). Resulta interesante que, excepto para el caso del hipocampo, existe una buena correlación entre las regiones

cerebrales que muestran un aumento de la apoptosis neuronal y aquellas que muestran un incremento de la tinción nuclear de los factores de transcripción NFATc. Tal es el caso de corteza, estriado, globo pálido y cerebelo. Correlativamente, amígdala, tálamo y colículo superior no mostraron ningún incremento de la apoptosis, ni de la translocación nuclear de los factores de transcripción (Figs. 34, 35 y datos no mostrados).

12. Inmunoreactividad de FasL tras litio crónico

Para explorar si el aumento de la translocación nuclear de los factores de transcripción NFAT da lugar a un aumento en el número de células Fas ligando (FasL) positivas, se realizó una inmunohistoquímica de FasL en secciones de cerebro de ratones control y ratones tratados con litio. Como se muestra en la Fig. 36, se encontró un incremento significativo en el número de células FasL positivas en el estriado y en el globo pálido de ratones tratados con litio. También se observó una tendencia a presentar un mayor número de células FasL positivas en el cerebelo de ratones tratados, pero no llegó a ser estadísticamente significativo (Fig. 36). Sin embargo, la corteza, que mostró ambos incrementos, en la incidencia de apoptosis y en el aumento de la translocación nuclear de los factores de transcripción NFAT, no mostró ninguna diferencia en el número de células FasL positivas. Esto se debe probablemente a que esta estructura cerebral muestra un mayor número de células FasL positivas en ratones no tratados que cualquier otra región cerebral (Fig. 36 y datos no mostrados). Es por tanto probable, que las neuronas corticales susceptibles de un aumento en la producción de FasL por la translocación de NFAT, estuvieran ya por encima de los niveles de detección por inmunohistoquímica en los ratones no tratados.

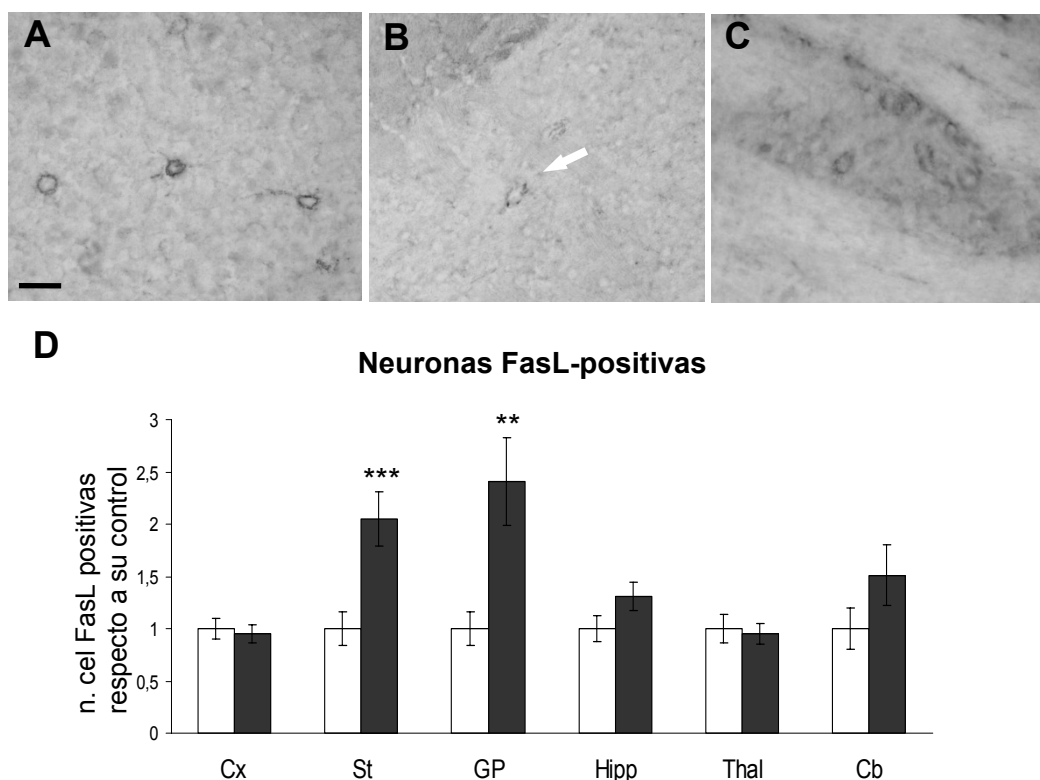


Figura 36. **Aumento del número de células FasL positivas en ratones tratados con litio crónico.** **A-C.** Inmunohistoquímica de FasL en secciones de cerebro de ratones tratados con litio. Las imágenes muestran células positivas en corteza (A), estriado (B) y globo pálido (C). Barra de escala en C corresponde a 40 μ m en (A) y a 30 μ m en (B-C). **D.** Histograma que muestra la cuantificación de células inmunoreactivas para FasL en ratones tratados con litio respecto de los ratones no tratados en las diferentes regiones (n=16 por grupo, 4 secciones/animal). Cx, corteza; St, estriado; GP, globo pálido; Hipp, hipocampo; Thal, tálamo; Cb, cerebelo. (** $p < 0,005$, *** $p < 0,002$).

Para confirmar más aún la hipótesis de que el aumento del número de células positivas para FasL se debe a la inhibición de GSK-3 y a la subsiguiente translocación nuclear de NFAT, se llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia, con doble marcaje, en secciones sagitales de ratones tratados con litio. Como se puede observar en la figura 37, se confirmó que las células FasL positivas eran neuronas por el doble marcaje con el marcador neuronal NeuN.

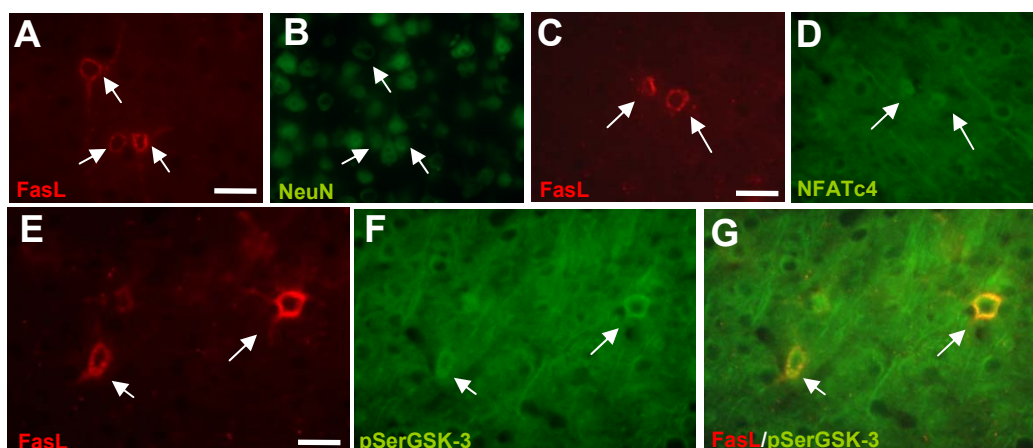


Figura 37. **Detección e identificación de células FasL positivas en ratones tratados con litio crónico.** A-B. Doble inmunofluorescencia con anticuerpos anti-FasL (A) y anti-NeuN (B) en el estriado de un ratón tratado con litio. Barra de escala en A corresponde a 20 μ m en (A,B). C-D. Doble inmunofluorescencia con anticuerpos anti-FasL (C) y anti-NFATc4 (D) en un ratón tratado con litio. Barra de escala en C corresponde a 20 μ m en (C,D). E-G. Doble inmunofluorescencia con anticuerpos anti-FasL (E), anti-pSer9GSK-3 β (F) y combinación de los anteriores (G) en un ratón tratado con litio. Barra de escala en C corresponde a 10 μ m en (E-G).

Más aún, las neuronas estriatales positivas para FasL coinciden con aquellas que muestran la tinción nuclear de NFATc4 (Fig. 37) y son también detectadas con un anticuerpo que reconoce GSK-3 inactiva (Fig. 37). El hecho de que coincidan simultáneamente la inactivación de GSK-3, la translocación nuclear de NFAT y la tinción de FasL en el mismo grupo de neuronas sostiene fuertemente que estos eventos estén funcionalmente relacionados y apoya el mecanismo de acción propuesto.

13. Muerte neuronal y coordinación motora en ratones deficientes de Fas tratados con litio

Para investigar si el aumento de la apoptosis en los ratones tratados con litio se debe a la activación del receptor de muerte Fas, se analizó la apoptosis neuronal tras la administración crónica de litio en un ratón deficiente en el receptor Fas (ratón *lrp*) mantenido en el mismo fondo genético (C57/Bl6) que los ratones salvajes utilizados hasta ese momento.

Puesto que la función renal está comprometida en este ratón *lrp*, la pauta de administración de litio utilizada previamente para ratones salvajes, en estos ratones *lpr*, da lugar a litemias ligeramente superiores a 1,5mM después de la cuarta semana, excediendo la ventana terapéutica en humanos y, por tanto, los niveles que hemos

establecido para este estudio. Por esta razón se modificó la pauta de administración en los ratones *lpr*, y así conseguir niveles de litio en suero comparables a los obtenidos en los ratones silvestres (cepa C57/Bl6) en los anteriores ejemplos (Fig. 38).

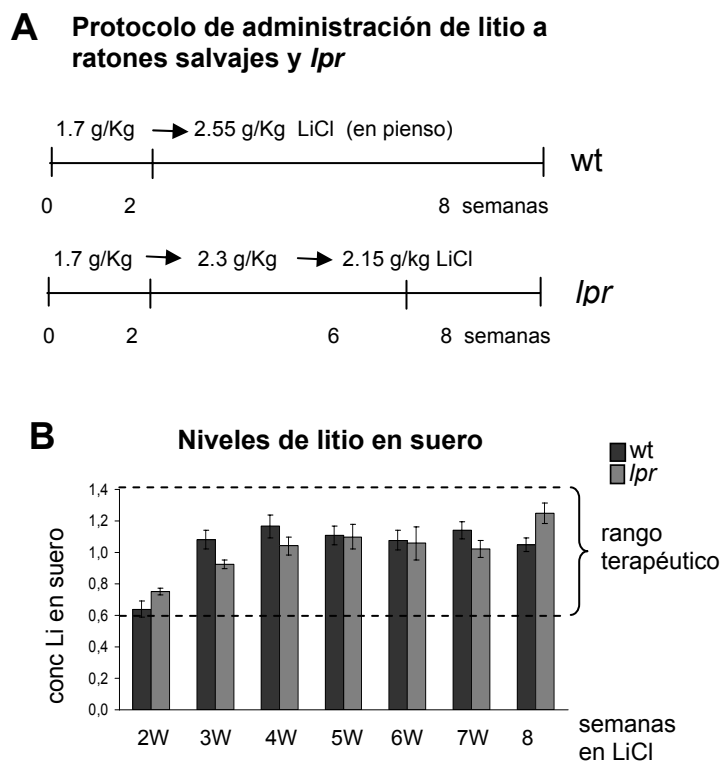


Figura 38. **Administración de litio a ratones salvajes y deficientes en Fas (*lpr*)** **A.** Diagrama mostrando el protocolo de administración de litio a ratones salvajes y *lpr*. **B.** Niveles semanales de litio en suero durante las 8 semanas de tratamiento a ratones salvajes y *lpr* (n=14 por grupo).

El análisis de la incidencia de apoptosis, por la tinción inmunohistoquímica de caspasa-3 activada, después del tratamiento con litio durante 8 semanas, reveló que el incremento de la apoptosis en corteza, estriado, globo pálido, hipocampo y cerebelo de los ratones salvajes tratados con litio se previno completamente en los ratones *lpr* tratados (Fig. 39). Esto demuestra que la apoptosis neuronal inducida por el tratamiento con litio está mediada por el receptor Fas.

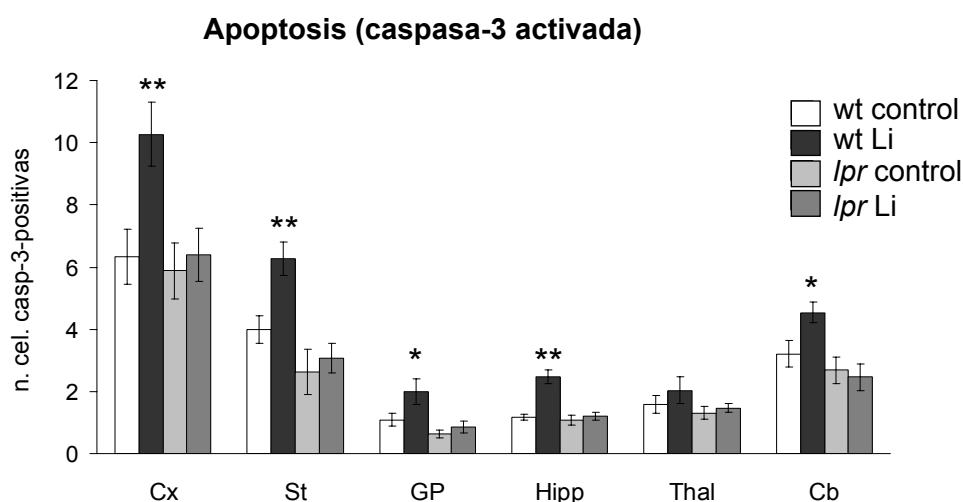


Figura 39. Apoptosis neuronal inducida por litio crónico en ratones salvajes y *lpr*. Histograma que muestra la cuantificación del número de células caspasa-3 positivas por sección sagital de 30 μ m en las diferentes regiones analizadas (n=8 por grupo, 4 secciones/animal). Cx, corteza; St, estriado; GP, globo pálido; Hipp, hipocampo; Thal, tálamo; Cb, cerebelo. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

En vista de la ausencia de neurotoxicidad inducida por litio en ratones *lpr*, se investigó si las consecuencias neurológicas motoras de la administración crónica de litio podrían estar también disminuidas en este ratón.

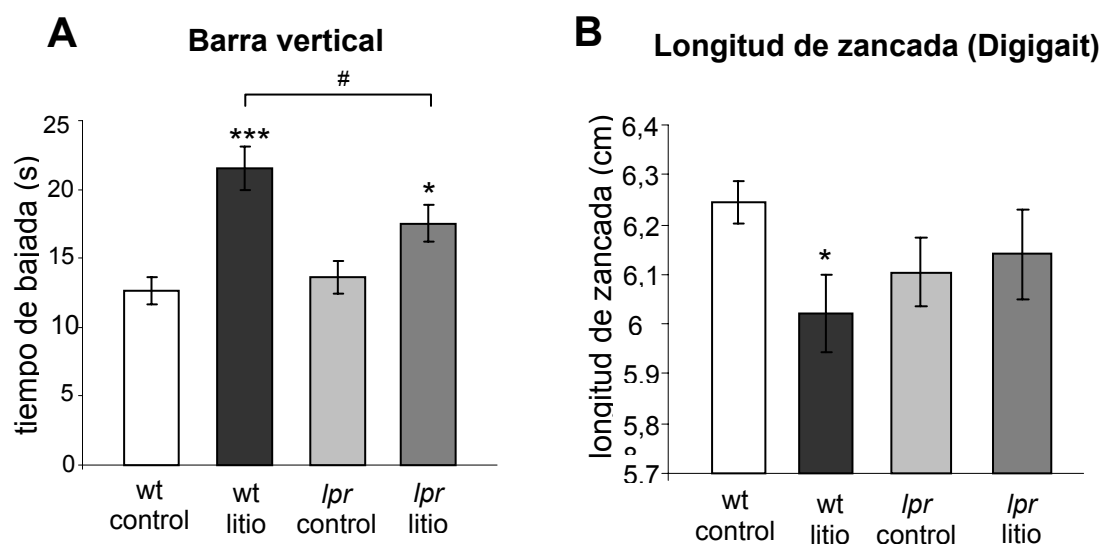


Figura 40. Déficit motor por litio crónico en ratones salvajes, pero no en *lpr*. **A.** Prueba de la barra vertical en ratones salvajes (wt) y *lpr* (* $p<0,05$, *** $p<0,001$, *se refiere a los ratones tratados vs sus controles respectivos, # se refiere a ratones, tanto salvajes como *lpr*, tratados con litio). **B.** Ejemplo de uno de los parámetros obtenidos con Digigait, longitud de la zancada. (n=20 por grupo en ambas pruebas)

Como se muestra en la Fig. 40, el déficit de coordinación motora inducido por litio (detectado por la prueba de la barra vertical y el análisis del modo de andar) observado en los ratones salvajes está atenuado o ausente en los ratones *lpr* tratados con litio. En el caso de la prueba de la barra vertical la recuperación es parcial, puesto que sigue existiendo diferencia entre ratones *lpr* tratados y sin tratar. Esta diferencia es menor que la detectada en ratones salvajes y, a su vez, existe una diferencia significativa entre los ratones salvajes tratados con litio y los ratones *lpr* también tratados con litio. Además, en parámetros como la longitud de zancada, en la que los ratones salvajes presentan una reducción, los ratones *lpr* no muestran diferencias entre tratados con litio y no tratados. Esto apoya fuertemente que la pérdida neuronal contribuya a los efectos secundarios motores de la administración crónica de litio y que esta pérdida neuronal ocurra por activación de la vía extrínseca de apoptosis dependiente de Fa

DISCUSIÓN

La implicación de GSK-3 en enfermedades ya sean neurodegenerativas, psiquiátricas o metabólicas, ha planteado la posibilidad de utilizar los inhibidores de GSK-3 como terapia frente a las mismas. Desde que se sugirió esta posibilidad, se han desarrollado numerosos compuestos de distinta naturaleza y con distintos mecanismos de inhibición de GSK-3. El objetivo fundamental de nuestro trabajo ha sido establecer las consecuencias neurológicas de una inhibición sostenida de GSK-3. En primer lugar, se utilizó un abordaje genético, mediante transgénesis condicional en ratón, que permitía dirigir la inhibición regional y temporalmente. En segundo lugar, se amplió el estudio a la inhibición de GSK-3 por medios farmacológicos. En este caso se utilizó el litio, un fármaco inhibidor de GSK-3 utilizado ampliamente como terapia en humanos y del que ya se conocían frecuentes efectos adversos neurológicos. Este último diseño, además nos ha permitido establecer el posible mecanismo molecular por el cual se producen dichos efectos adversos.

Efecto tóxico de la inhibición de GSK-3 mediante expresión transgénica de una forma dominante negativa

El diseño del ratón con el promotor de la $CaMKII\alpha$ y con el sistema condicional regulado por tetraciclina permitió obtener ratones con inhibición de GSK-3 en neuronas adultas que resultaron ser viables. La caracterización de estos ratones transgénicos reveló una mayor incidencia de apoptosis en estriado y corteza. Además, este efecto correlacionaba con un déficit en coordinación motora.

En el ratón Tet/DN-GSK-3, el estriado ha resultado ser la región más vulnerable en el fenotipo de apoptosis neuronal. Hecho esperable, puesto que el estriado es la única estructura que mostró una disminución de actividad GSK-3 en el ensayo enzimático *in vitro*. En corteza, aunque no se pudo detectar una reducción significativa de la actividad quinasa de GSK-3, sí existía una tendencia. A pesar de esto, el aumento en la tasa de muerte neuronal también resultó significativo en corteza. La clave para explicar esta diferencia puede radicar en que en el estriado la mayoría de las neuronas expresan el transgén, mientras que en la corteza la expresión se restringe a determinadas poblaciones neuronales. En concreto, la expresión en corteza se detecta fundamentalmente en las capas II y III. Como los homogeneizados de corteza utilizados para los ensayos de actividad enzimática incluyen todas las capas de la corteza, la dilución de las neuronas transgénicas en el total de neuronas del tejido puede impedir ver un efecto global a nivel bioquímico. Al estudiar la incidencia de apoptosis, el análisis

se realizó a nivel celular, por conteo directo. Por tanto, el análisis histológico sí permitió ver una diferencia significativa en el número de neuronas apoptóticas.

Al ser el estriado y la corteza dos regiones implicadas directamente en el control de la coordinación motora, se pensó que la mayor incidencia de muerte neuronal podría conducir a un déficit en la coordinación motora. Efectivamente, esto se puso de manifiesto con la realización de pruebas de comportamiento como el Rota-Rod, el descenso de la barra vertical y el análisis del modo de andar por el patrón de huellas. En todas estas pruebas los ratones Tet/DN-GSK-3 presentaban una deficiencia en la coordinación motora.

Por otro lado, los resultados reportados por el grupo de M. Caron atribuyen un papel fundamental a GSK-3 como mediador de la acción de dopamina en el estriado (Beaulieu, 2004), lo que una alteración en esta ruta podría contribuir al déficit motor. El estudio de respuesta a anfetamina realizado pone de manifiesto una alteración en la ruta de señalización por dopamina en el ratón Tet/DN-GSK-3, a la vez que reproduce los datos obtenidos por Beaulieu y cols. con ratones heterocigotos del mutante nulo de GSK-3 (GSK-3^{+/-}). Por tanto, el déficit motor podría ser debido a apoptosis de neuronas estriatales, a una respuesta reducida a dopamina o a ambos.

Inicialmente nos sorprendió que el transgén DN-GSK-3 resultara en una mayor incidencia de muerte neuronal, ya que existían numerosos estudios que apoyaban un papel neuroprotector y antiapoptótico de los inhibidores de GSK-3 (Beurel and Jope, 2006; Frame and Cohen, 2001; Grimes and Jope, 2001). Como se menciona en la introducción, estos estudios abarcan múltiples estímulos tales como retirada de aporte trófico, inhibición de la ruta de supervivencia PI3K, daño del ADN, toxinas mitocondriales, hipoxia/isquemia y toxicidad por glutamato entre otras (Beurel and Jope, 2006; Hetman et al., 2000; Pap and Cooper, 1998). Sin embargo, había sido reportado que la disminución de la actividad GSK-3 por interrupción del gen de GSK-3 β tiene como consecuencia la letalidad embrionaria, causada por apoptosis masiva en el hígado (Hoeflich et al., 2000). Nuestros resultados confirman que la inhibición crónica de la actividad GSK-3 compromete la viabilidad celular y extiende este resultado a tejidos adultos y a células post-mitóticas como las neuronas.

Además, existen otros estudios en los que la inhibición de GSK-3 resulta en un aumento de la apoptosis. Más concretamente, en la apoptosis inducida por TNF α (Beyaert et al., 1989; Hoeflich et al., 2000) o por anticuerpos anti-Fas (Beurel and Jope, 2006; Song et al., 2004).

Como se ha descrito anteriormente, GSK-3 juega un papel dual en apoptosis (Beurel and Johe, 2006). Según las evidencias en el campo de este doble papel de GSK-3, parece lógico pensar que la inhibición de GSK-3 facilitará la apoptosis cuando ésta se esté ejecutando por la vía extrínseca (implicando la estimulación de receptores extracelulares de muerte) y que, por el contrario, protegerá a la célula de una apoptosis inducida por la vía intrínseca (mediada por la mitocondria). Cabría pensar que, entre las células embrionarias de hígado y las neuronas adultas de corteza y estriado, existen unas características comunes en el caso de la respuesta a señales extracelulares capaces de estimular receptores de muerte. En concreto, compartirían la necesidad de unos niveles de GSK-3 mínimos que prevengan el desencadenamiento de la apoptosis.

La administración de litio reproduce los efectos de la expresión del DN-GSK-3

En vista de los resultados de toxicidad obtenidos en el ratón Tet/DN-GSK-3, nos planteamos explorar si una administración crónica de litio tendría las mismas consecuencias. Podríamos establecer así una relación entre la muerte celular en determinadas áreas y los efectos adversos motores, evidenciados durante los muchos años que se lleva administrando litio como tratamiento en enfermedades como el trastorno bipolar (rev. en Baldessarini, 2002). Es importante destacar que algunos efectos adversos no ocurren a concentraciones de litio elevadas, que producen una intoxicación severa, sino a concentraciones efectivas para la enfermedad y dentro del rango terapéutico, lo que compromete su prescripción como tratamiento.

La administración de litio crónico a dosis elevadas, pero siempre dentro de los niveles terapéuticos, utilizada en el presente estudio, nos permitió ver una toxicidad similar a la obtenida al inhibir GSK-3 en el ratón transgénico. En este modelo concretamente, se pudo ver un aumento de la apoptosis en regiones como corteza, estriado, hipocampo y cerebelo. Algunas de estas regiones suponen un efecto ampliado con respecto al obtenido en el caso del ratón Tet/DN-GSK-3. Para establecer esta comparación hay que tener presente que en el caso del ratón transgénico, la expresión estaba restringida a regiones donde se expresaba el promotor de la CamKII α , regiones que no incluyen el cerebelo, y a las características de expresión en sólo unas determinadas poblaciones neuronales dentro de cada región.

Además el litio podría estar acentuando el efecto de la inhibición de GSK-3 en la señalización dopaminérgica. Según estudios recientes, el litio estaría afectando a la formación del complejo formado por el receptor de dopamina, Akt, PP-2A y β -arrestina, por tanto favoreciendo la inhibición de GSK-3 (Beaulieu, 2007; Beaulieu, 2008)(Vease esquema en la pag. 60).

El litio, además de inhibir a la GSK-3, actúa también sobre enzimas como la inositol polifosfato 1-fosfatasa (IPPasa), la inositol monofosfato fosfatasa (IMPasa), la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa), la bisfosfato nucleotidasa (BPNasa) y la fosfoglucomutasa (PGM) (Gould et al., 2006). A pesar de que la acción inhibitoria del litio no se reduce simplemente a GSK-3, la analogía entre los resultados obtenidos con el litio crónico y los obtenidos con la inhibición genética de GSK-3, confirman que este efecto es debido a la acción del litio sobre GSK-3.

En resumen, la administración crónica de litio a ratones normales, según el protocolo utilizado en este estudio, nos revela un modelo útil para el análisis del mecanismo por el cual se producen los efectos adversos en la administración crónica de litio.

Potencial terapéutico de los inhibidores de GSK-3 y sus limitaciones

Como ya se ha mencionado, existen nuevos inhibidores potentes y selectivos de GSK-3 que se están desarrollando y probando para el tratamiento de enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, trastornos psiquiátricos y diabetes (Cohen and Goedert, 2004; Gould et al., 2006).

En este sentido, los ratones Tet/DN-GSK-3 pueden ser una buena herramienta para predecir el potencial terapéutico de inhibidores de GSK-3. Para explorar este potencial sería necesario combinar estos ratones con ratones que sean modelos de enfermedad y así determinar si las características patológicas de estos modelos se previenen con una disminución en la actividad GSK-3. En el caso de la EA, se ha asociado GSK-3 a la producción del péptido β -amiloide ($A\beta$) a partir de su precursor APP (Phiel et al., 2003; Ryder et al., 2003; Sun et al., 2002), como mediador de la toxicidad del péptido β -amiloide (Alvarez et al., 1999; Takashima et al., 1993), como implicado en la toxicidad de la presenilina-1 (PS-1) mutante (Takashima et al., 1998) y en la hiperfosforilación de tau (Hanger et al., 1992; Lovestone et al., 1994). Puesto que el ratón Tet/DN-GSK-3 ya posee la ventaja de expresar el transgén en neuronas de regiones cerebrales afectadas en la EA, sería interesante combinar estos ratones con alguno de los numerosos modelos de

enfermedad disponibles, los cuales presentan modificaciones en la expresión de APP, PS-1 o tau (Lim et al., 2001; Wong et al., 2002) o combinaciones de éstos (Engel et al., 2006c). Una vez obtenidos los ratones resultantes de la combinación, se estudiaría la mejora de las alteraciones neuropatológicas y el déficit en aprendizaje. Si las características inherentes a la patología en cada modelo animal mejoran o desaparecen, esto apoyaría fuertemente el potencial terapéutico de los inhibidores de la enfermedad de Alzheimer.

Por otro lado, el estudio de la inhibición de GSK-3 por expresión del DN-GSK-3 permite realizar una aproximación a la utilidad de los inhibidores de GSK-3 en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas, como el trastorno bipolar o la esquizofrenia. Para llevar estos estudios a cabo, sería necesario, bien administrar fármacos cuyos efectos se relacionan con comportamientos psicóticos, como la dizocilpina (MK-801), la fenciclidina (PCP) o la ketamina (Bubenikova-Valesova et al., 2008) a los ratones Tet/DN-GSK-3, o bien cruzar éstos por ratones modelos de esquizofrenia como el ratón con una mutación en DISC1 (Koike et al., 2006; Kvajo et al., 2008), entre otros. Los datos hallados en un ratón con menor actividad de DISC1 apuntan a que la proliferación de progenitores neurales está regulada por DISC1 mediante inhibición de GSK-3 (Mao et al., 2009). Según esto, el ratón resultante del cruce de Tet/DN-GSK-3 con el mutante de DISC1 (Koike et al., 2006), que presenta una maduración alterada de los progenitores neurales, así como deficiencias en memoria operativa, tendría que mostrar una reversión de los defectos que presenta el ratón con DISC1 truncado (Kvajo et al., 2008).

En cambio, para realizar un estudio equivalente del potencial terapéutico de inhibidores de GSK-3 en diabetes, el abordaje debería ser distinto. En este caso sería necesario, en primer lugar, conseguir expresar la forma dominante negativa de GSK-3 en músculo o hígado. Para ello se hace necesario generar un nuevo ratón Tet/DN-GSK-3 utilizando un promotor de expresión de tTA en hígado y/o músculo. Este ratón se combinaría entonces con modelos químicos (Eldar-Finkelman et al., 1999) o con los diversos modelos genéticos de diabetes como los ratones ob/ob, TSOD, IGF1-/- ó IRS-/- entre otros (Accili et al., 1996; Hirayama et al., 1999; Soli et al., 1975; Sone et al., 2001; Tamemoto et al., 1994).

Las características del ratón Tet/DN-GSK-3 con respecto a la señalización dopaminérgica sugieren su utilidad como herramienta para explorar la implicación de GSK-3 en la señalización dependiente de DA. Por lo expuesto en los resultados, el ratón Tet/DN-GSK-3 reproduce la alteración encontrada en otros ratones con la actividad GSK-3 disminuida, los ratones heterocigotos del mutante nulo (GSK-3 +/-) (Beaulieu et

al., 2004). Además, el estudio de la inhibición de GSK-3 por expresión del DN-GSK-3 puede ayudar a desentrañar el mecanismo de acción de los antipsicóticos, fundamentalmente la acción relacionada con la ruta dopaminérgica.

Nuestro grupo, en colaboración con el grupo de F. Artigas, se planteó estudiar la acción de los agonistas sobre los distintos receptores de dopamina en el ratón Tet/DN-GSK-3. En concreto decidimos utilizar un agonista del receptor D1 (SKF 81297) y un agonista de la familia de receptores D2 (quinpirol) (Ferre et al., 1994). Nuestros recientes resultados con estos agonistas en experimentos de microdiálisis y de exploración en campo abierto, revelan que la respuesta a la administración del quinpirol es menor en el ratón Tet/DN-GSK-3, mientras que no hay diferencia en la respuesta al SKF. Por tanto, estos datos apuntan a que la alteración en la señalización dopaminérgica en los ratones Tet/DN-GSK-3 es selectivamente dependiente de los receptores D2.

Independientemente de la patología a la que se aplicaran, los resultados mostrados en esta tesis son indicativos de los posibles efectos adversos de una inhibición prolongada de GSK-3. Estos resultados y los futuros estudios derivados de éstos pueden resultar muy útiles para que los inhibidores de GSK-3 lleguen con éxito a la clínica y se expanda su uso a diversas patologías.

Respecto a los posibles efectos secundarios, previamente a nuestro trabajo, uno de los principales temores al plantear el uso de inhibidores de GSK-3 era el posible potencial tumorigénico (Polakis, 2000). En este sentido, aunque tampoco ha sido objeto de un análisis exhaustivo, no se ha detectado una mayor incidencia de tumores ni con la inhibición por expresión de la forma dominante negativa de GSK-3 ni por administración de litio. En el primer caso, no era de esperar la aparición de tumores puesto que el promotor utilizado se restringía a neuronas que son células post-mitóticas. Para poder confirmar el riesgo tumorigénico por medios genéticos sería más apropiado utilizar, en la generación del doble transgénico, un ratón que exprese tTA bajo un promotor menos restrictivo. Además, al igual que ocurría en el mutante nulo de GSK-3 (Hoeftlich et al., 2000), no se ha visto acumulación de β -catenina, lo que podría haber sido un indicativo de riesgo tumorigénico. Aunque, según estudios posteriores a la generación del mutante nulo, se ha visto que GSK-3 α reemplazaba a la forma β en la regulación de la β -catenina (Asuni et al., 2006; Doble and Woodgett, 2003). En el caso de la inhibición por administración de litio, el protocolo de administración utilizado posiblemente no es lo suficientemente prolongado como para ver un posible efecto tumorigénico. Sin embargo, tampoco se contemplaba la posibilidad de formación de tumores puesto que no existen evidencias de un mayor riesgo en enfermos bipolares

tratados con litio de forma más prolongada (Baldessarini, 2002); Macritchie and Young, 2004).

La potenciación de la apoptosis, otro de los posibles efectos de la inhibición crónica de GSK-3 que se habían contemplado (Beyaert et al., 1989; Hoeflich et al., 2000; Song et al., 2004), ha sido confirmado por ambos métodos: la inhibición genética y la inhibición farmacológica.

Por último, ya sea o no una consecuencia directa de la mayor incidencia de apoptosis, también hemos establecido por ambas aproximaciones el déficit motor como otro de los efectos adversos.

Nuestros hallazgos de efectos adversos tras una inhibición sostenida de GSK-3 no deberían tomarse necesariamente como un obstáculo a la proyección de los inhibidores a la clínica. Desde un principio, se ha postulado la eficacia de éstos como tratamiento en casos de una actividad GSK-3 aberrantemente incrementada (Cohen and Goedert, 2004; Meijer et al., 2004), alteración que se postula como una posible causa de las enfermedades para las que se proponía el uso de los inhibidores. En el caso patológico de elevada actividad GSK-3, la acción de los inhibidores de GSK-3 sería beneficiosa al restaurar unos niveles normales de GSK-3. Los resultados aquí descritos relacionados con posibles consecuencias indeseadas, simplemente pretenden alertar sobre la importancia del mantenimiento de unos niveles mínimos de actividad GSK-3 por debajo de los cuales se produciría un efecto tóxico.

Un ejemplo que ilustraría esta casuística sería el estudio realizado recientemente por Hu y cols. En este estudio se demuestra que la inhibición de GSK-3 en condiciones patológicas, que en este caso sería la toxicidad por el péptido β -amiloide, es beneficiosa y resulta en neuroprotección. En cambio, en los controles, se vio que la inhibición de GSK-3 por sí misma producía toxicidad, posiblemente por haber descendido de los niveles basales de actividad GSK-3 (Hu et al., 2009).

En cualquier caso, los resultados de reversión en el caso del ratón Tet/DN-GSK-3 parecen tranquilizadores con respecto a una posible intoxicación, que produciría un descenso de la actividad basal de GSK-3. El hecho de que la incidencia de apoptosis y los efectos motores desaparezcan tras el silenciamiento del transgén, es decir, tras el restablecimiento de los niveles normales de actividad GSK-3, hacen pensar que los efectos adversos desaparecerían tras el abandono temporal de la medicación. Además, datos preliminares de nuestro grupo sugieren que la toxicidad observada por litio crónico en ratones, tanto motora como de apoptosis, también se revierten cuando se suspende el tratamiento con litio.

Mecanismo de neurotoxicidad del litio

Por último, el haber identificado la ruta NFAT/Fas como mediador de la toxicidad del tratamiento con litio nos da dos nuevas claves acerca de la problemática de los tratamientos con inhibidores de GSK-3.

Por un lado, como la ruta NFAT/Fas participa en multitud de procesos inflamatorios (rev. en (Rao et al., 1997), nos advierte de una posible mayor incidencia de efectos adversos de los inhibidores en ciertos grupos de pacientes, como los ancianos. Esto encajaría con la reportada dificultad de analizar el potencial terapéutico del litio en ancianos con EA (Macdonald et al., 2008). Este estudio sobre la practicabilidad y tolerancia del litio como tratamiento para enfermos de Alzheimer pone de manifiesto la dificultad de un tratamiento con litio no sólo por los efectos adversos propios, sino también por la estrecha monitorización que hay que llevar a cabo y las posibles interacciones con otros fármacos. Estos efectos tóxicos, que son más acentuados en personas mayores, y el resto de dificultades que presenta el tratamiento son aún más graves si se trata se enfermos que presentan cierto grado de demencia (Macdonald et al., 2008).

Por otro lado, permite diseñar terapias combinadas con otros fármacos que atenúen la toxicidad por la ruta de NFAT/Fas, tales como la ciclosporina A (CsA) o el Tacrolimus (FK506), los cuales presentan la ventaja de ser fármacos que ya se utilizan en clínica. La ciclosporina A fue descubierta como inmunosupresor en 1976 (Borel et al., 1976) y se utiliza en clínica desde 1983. La ciclosporina A es un inhibidor de la calcineurina (CaN) o PP2B, por tanto afecta al factor de transcripción NFAT, evitando su translocación al núcleo (Schreiber and Crabtree, 1992). Como desventaja, la ciclosporina A presenta también efectos adversos propios. Estos efectos se derivan de las múltiples funciones de la CaN, que es una fosfatasa que actúa en otras células además de en las del sistema inmune. Por tanto, sería aconsejable la utilización de inhibidores de NFAT más selectivos (Kiani et al., 2000).

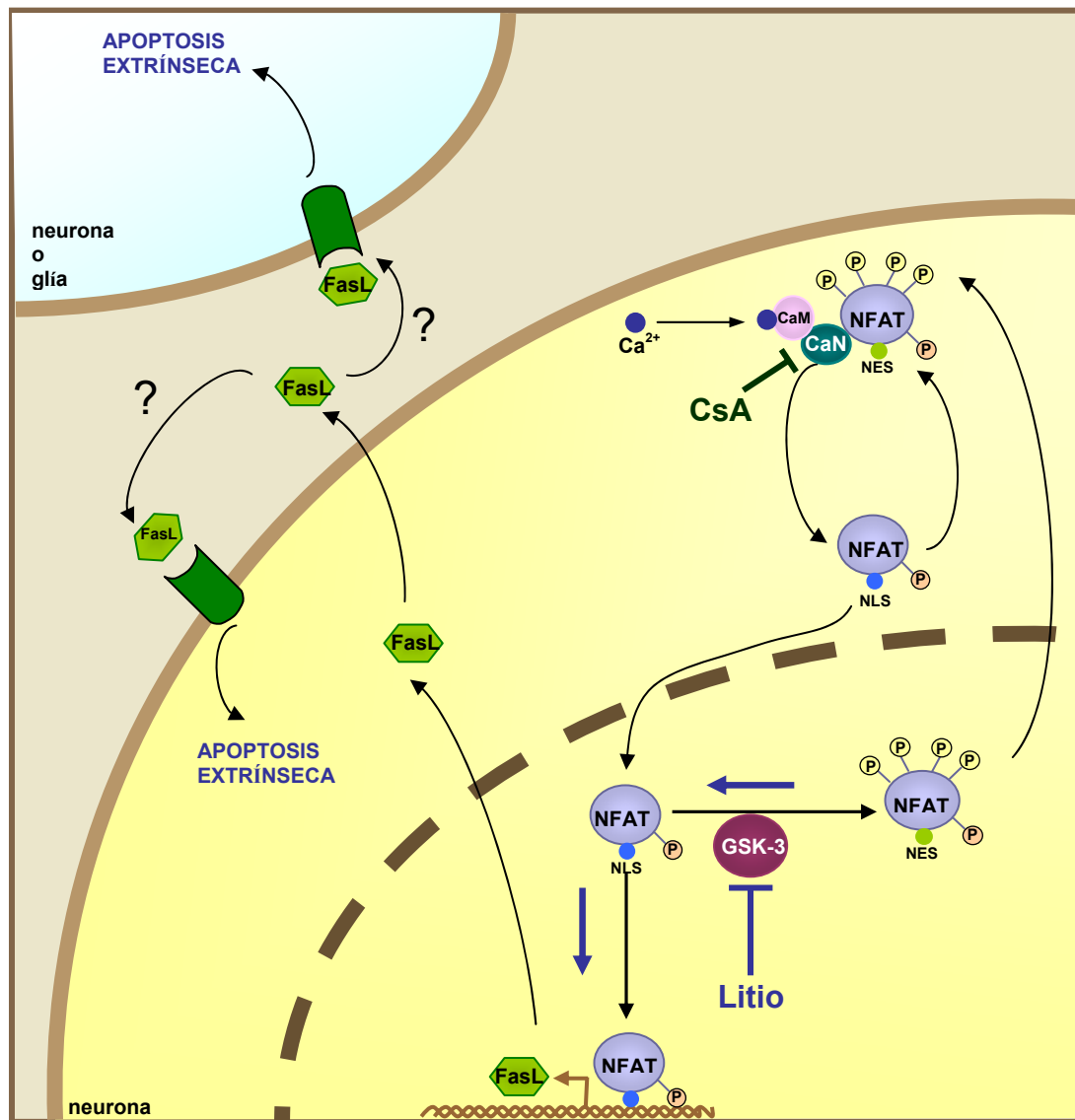


Figura 41. **Esquema del mecanismo propuesto para la toxicidad producida por litio.** Según este mecanismo, la inhibición de GSK-3 podría estar favoreciendo la forma defosforilada de NFAT, resultando en una mayor translocación de éste al núcleo. La presencia de NFAT en el núcleo daría lugar a una mayor expresión de FasL, favoreciendo, por tanto, la apoptosis por la vía extrínseca dependiente del receptor de Fas. El efecto apoptótico de FasL puede ser autocrino o paracrino. La ciclosporina (CsA) actuaría inhibiendo a la calcineurina (CaN) y, por tanto, evitando la translocación nuclear de NFAT.

En estudios preliminares, hemos visto que la administración combinada de litio crónico con ciclosporina A en ratones consigue revertir los efectos adversos que se derivan de la administración de litio, como la elevada tasa de apoptosis o los efectos motores. Estos resultados apoyan la hipótesis del mecanismo propuesto para los efectos adversos a través de la ruta NFAT/Fas, como ya lo hicieran los resultados obtenidos con los ratones deficientes en Fas, y presentan una alternativa para minimizar los efectos adversos producidos por los inhibidores de GSK-3.

Por otro lado, en los últimos años ha habido un interés creciente por la relación entre la CaN y la toxicidad producida por el péptido A β en la EA. Estos estudios se basan principalmente en una alteración de la homeostasis del calcio producida por el péptido β -amiloide, que podría estar mediada por un aumento de actividad de la calcineurina (Agostinho et al., 2008; Cho et al., 2008; Kuchibhotla et al., 2008). Estos estudios se han centrado en distintas consecuencias de esta alteración como son la degeneración de neuritas (Kuchibhotla et al., 2008; Zeng et al., 2007), la translocación de BAD a la mitocondria promoviendo la liberación de calcio (Agostinho et al., 2008) o el aumento de expresión de BACE1 (Cho et al., 2008). Este último estaría además mediado por la translocación al núcleo de NFAT1. En todos estos estudios se han podido revertir los efectos con CsA o FK506. Además en el ratón Tg2576, que presenta acumulación de A β , se ha visto un incremento en la regulación de CaN (Dineley et al., 2007) y también en la actividad de NFAT1 (Cho et al., 2008). En estos mismos ratones también se ha descrito una mejora en la memoria activa por administración aguda de FK506 (Dineley et al., 2007). La reversión por inhibición de calcineurina de estas alteraciones inducidas por el péptido A β podría ser un efecto beneficioso añadido al uso combinado de inhibidores de GSK-3 con ciclosporina en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Sin embargo, también se ha visto una disminución de la actividad de CaN en cerebros de pacientes de EA, que podría estar favoreciendo la formación o estabilización de los ovillos neurofibrilares (Lian et al., 2001). Por esto y por los efectos adversos propios de la ciclosporina (Kiani et al., 2000), sería deseable buscar inhibidores de la ruta NFAT/Fas que no implicaran la inhibición de la calcineurina.

Los datos aquí obtenidos aportan claves para un exitoso uso de los inhibidores de GSK-3, no sólo por la posibilidad de disminuir los efectos adversos producidos por éstos, sino también por la potencial extensión de la aplicación tanto del litio como de los

CONCLUSIONES

1. La inhibición de GSK-3 en cerebro adulto de ratones, tanto por medios genéticos como por administración de litio, potencia la apoptosis neuronal en numerosas regiones cerebrales tales como el estriado, la corteza, el globo pálido, el hipocampo y el cerebelo.
2. La inhibición de GSK-3 por ambas aproximaciones tiene como consecuencia un déficit en la coordinación motora de los ratones.
3. Los efectos adversos, tanto la apoptosis como el déficit motor, revierten al normalizar la actividad GSK-3.
4. La inhibición de GSK-3 por litio produce un aumento de la translocación nuclear de factores de transcripción de la familia NFAT en la mayoría de estructuras que presentaban aumento de células apoptóticas.
5. La inhibición de GSK-3 por litio produce un aumento en la expresión de FasL fundamentalmente en estriado y globo pálido.
6. El mecanismo por el cual se produce la apoptosis mediada por litio es dependiente de la ruta del receptor Fas, como se ha podido comprobar por la ausencia de efectos en los ratones *lpr* (Fas deficientes).
7. Las conclusiones anteriores sugieren que la apoptosis inducida por litio crónico se debe a la activación de la ruta NFAT-FasL- Fas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*, **16**, 3797-3804.
- Accili, D., Drago, J., Lee, E.J., Johnson, M.D., Cool, M.H., Salvatore, P., Asico, L.D., Jose, P.A., Taylor, S.I. and Westphal, H. (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet*, **12**, 106-109.
- Agostinho, P., Lopes, J.P., Velez, Z. and Oliveira, C.R. (2008) Overactivation of calcineurin induced by amyloid-beta and prion proteins. *Neurochem Int*, **52**, 1226-1233.
- Alimohamad, H., Rajakumar, N., Seah, Y.H. and Rushlow, W. (2005a) Antipsychotics alter the protein expression levels of beta-catenin and GSK-3 in the rat medial prefrontal cortex and striatum. *Biol Psychiatry*, **57**, 533-542.
- Alimohamad, H., Sutton, L., Mouyal, J., Rajakumar, N. and Rushlow, W.J. (2005b) The effects of antipsychotics on beta-catenin, glycogen synthase kinase-3 and dishevelled in the ventral midbrain of rats. *J Neurochem*, **95**, 513-525.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E. and Diaz-Nido, J. (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett*, **453**, 260-264.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N. and Murtagh, F.R. (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*, **8**, 429-431.
- Arguello, P.A. and Gogos, J.A. (2006) Modeling madness in mice: one piece at a time. *Neuron*, **52**, 179-196.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
- Assuncao Guimaraes, C. and Linden, R. (2004) Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem*, **271**, 1638-1650.
- Asuni, A.A., Hooper, C., Reynolds, C.H., Lovestone, S., Anderton, B.H. and Killick, R. (2006) GSK3alpha exhibits beta-catenin and tau directed kinase activities that are modulated by Wnt. *Eur J Neurosci*, **24**, 3387-3392.
- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M. and Hernandez, F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*, **84**, 361-384.
- Baldessarini, R.J. (2002) Treatment research in bipolar disorder: issues and recommendations. *CNS Drugs*, **16**, 721-729.
- Barlow, C., Hirotsume, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D. and Wynshaw-Boris, A. (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*, **86**, 159-171.
- Beals, C.R., Clipstone, N.A., Ho, S.N. and Crabtree, G.R. (1997a) Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev*, **11**, 824-834.
- Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P. and Crabtree, G.R. (1997b) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*, **275**, 1930-1934.
- Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R. and Caron, M.G. (2007) The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends Pharmacol Sci*, **28**, 166-172.
- Beaulieu, J.M., Marion, S., Rodriguiz, R.M., Medvedev, I.O., Sotnikova, T.D., Ghisi, V., Wetsel, W.C., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R. and Caron, M.G. (2008) A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell*, **132**, 125-136.
- Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Yao, W.D., Kockeritz, L., Woodgett, J.R., Gainetdinov, R.R. and Caron, M.G. (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent

- behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5099-5104.
- Behrens, J., Jerchow, B.A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D. and Birchmeier, W. (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, **280**, 596-599.
- Beurel, E. and Jope, R.S. (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol*, **79**, 173-189.
- Beurel, E., Kornprobst, M., Blivet-Van Eggelpoel, M.J., Ruiz-Ruiz, C., Cadoret, A., Capeau, J. and Desbois-Mouthon, C. (2004) GSK-3beta inhibition by lithium confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis through the repression of CD95 (Fas/APO-1) expression. *Exp Cell Res*, **300**, 354-364.
- Beyaert, R., Vanhaesebroeck, B., Suffys, P., Van Roy, F. and Fiers, W. (1989) Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9494-9498.
- Bhat, R., Xue, Y., Berg, S., Hellberg, S., Ormo, M., Nilsson, Y., Radesater, A.C., Jerning, E., Markgren, P.O., Borgegard, T., Nylof, M., Gimenez-Cassina, A., Hernandez, F., Lucas, J.J., Diaz-Nido, J. and Avila, J. (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J Biol Chem*, **278**, 45937-45945.
- Bhat, R.V., Shanley, J., Correll, M.P., Fieles, W.E., Keith, R.A., Scott, C.W. and Lee, C.M. (2000) Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11074-11079.
- Blalock, E.M., Geddes, J.W., Chen, K.C., Porter, N.M., Markesbery, W.R. and Landfield, P.W. (2004) Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2173-2178.
- Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U. and Stahelin, H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*, **6**, 468-475.
- Bubenikova-Valesova, V., Horacek, J., Vrajova, M. and Hoschl, C. (2008) Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev*, **32**, 1014-1023.
- Cardona-Gomez, P., Perez, M., Avila, J., Garcia-Segura, L.M. and Wandosell, F. (2004) Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci*, **25**, 363-373.
- Carmichael, J., Sugars, K.L., Bao, Y.P. and Rubinsztein, D.C. (2002) Glycogen synthase kinase-3beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem*, **277**, 33791-33798.
- Cohen, P., Alessi, D.R. and Cross, D.A. (1997) PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett*, **410**, 3-10.
- Cohen, P. and Goedert, M. (2004) GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 479-487.
- Cohen, P., Nimmo, H.G. and Proud, C.G. (1978) How does insulin stimulate glycogen synthesis? *Biochem Soc Symp*, 69-95.
- Cole, A., Frame, S. and Cohen, P. (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J*, **377**, 249-255.
- Cummings, J.L. (2004) Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, **351**, 56-67.

- Chalecka-Franaszek, E. and Chuang, D.M. (1999) Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8745-8750.
- Cho, H.J., Jin, S.M., Youn, H.D., Huh, K. and Mook-Jung, I. (2008) Disrupted intracellular calcium regulates BACE1 gene expression via nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT 1) signaling. *Aging Cell*, **7**, 137-147.
- Dale, T.C. (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J*, **329** (Pt 2), 209-223.
- De Sarno, P., Bijur, G.N., Zmijewska, A.A., Li, X. and Jope, R.S. (2006) In vivo regulation of GSK3 phosphorylation by cholinergic and NMDA receptors. *Neurobiol Aging*, **27**, 413-422.
- De Sarno, P., Li, X. and Jope, R.S. (2002) Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology*, **43**, 1158-1164.
- Deuschl, G., Raethjen, J., Baron, R., Lindemann, M., Wilms, H. and Krack, P. (2000) The pathophysiology of parkinsonian tremor: a review. *J Neurol*, **247** Suppl 5, V33-48.
- Diaz-Hernandez, M., Torres-Peraza, J., Salvatori-Abarca, A., Moran, M.A., Gomez-Ramos, P., Alberch, J. and Lucas, J.J. (2005) Full motor recovery despite striatal neuron loss and formation of irreversible amyloid-like inclusions in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*, **25**, 9773-9781.
- Dineley, K.T., Hogan, D., Zhang, W.R. and Taglialetela, G. (2007) Acute inhibition of calcineurin restores associative learning and memory in Tg2576 APP transgenic mice. *Neurobiol Learn Mem*, **88**, 217-224.
- Doble, B.W. and Woodgett, J.R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, **116**, 1175-1186.
- Dominguez, I., Itoh, K. and Sokol, S.Y. (1995) Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8498-8502.
- Eldar-Finkelman, H. (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med*, **8**, 126-132.
- Eldar-Finkelman, H. and Krebs, E.G. (1997) Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9660-9664.
- Eldar-Finkelman, H., Schreyer, S.A., Shinohara, M.M., LeBoeuf, R.C. and Krebs, E.G. (1999) Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes*, **48**, 1662-1666.
- Emamian, E.S., Hall, D., Birnbaum, M.J., Karayiorgou, M. and Gogos, J.A. (2004) Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet*, **36**, 131-137.
- Embi, N., Rylatt, D.B. and Cohen, P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, **107**, 519-527.
- Engel, T., Goni-Oliver, P., Lucas, J.J., Avila, J. and Hernandez, F. (2006a) Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem*, **99**, 1445-1455.
- Engel, T., Hernandez, F., Avila, J. and Lucas, J.J. (2006b) Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci*, **26**, 5083-5090.

- Engel, T., Lucas, J.J., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Avila, J. and Hernandez, F. (2006c) Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging*, **27**, 1258-1268.
- Ferre, S., Cortes, R. and Artigas, F. (1994) Dopaminergic regulation of the serotonergic raphe-striatal pathway: microdialysis studies in freely moving rats. *J Neurosci*, **14**, 4839-4846.
- Frame, S. and Cohen, P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*, **359**, 1-16.
- Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R.A., Hasegawa, M., Smith, M.J. and Spillantini, M.G. (1998) Intraneuronal filamentous tau protein and alpha-synuclein deposits in neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans*, **26**, 463-471.
- Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C., Parisi, J.E. and Hyman, B.T. (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **41**, 17-24.
- Goold, R.G. and Gordon-Weeks, P.R. (2001) Microtubule-associated protein 1B phosphorylation by glycogen synthase kinase 3beta is induced during PC12 cell differentiation. *J Cell Sci*, **114**, 4273-4284.
- Goold, R.G., Owen, R. and Gordon-Weeks, P.R. (1999) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci*, **112** (Pt 19), 3373-3384.
- Gould, T.D., Einat, H., Bhat, R. and Manji, H.K. (2004) AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int J Neuropsychopharmacol*, **7**, 387-390.
- Gould, T.D., Picchini, A.M., Einat, H. and Manji, H.K. (2006) Targeting glycogen synthase kinase-3 in the CNS: implications for the development of new treatments for mood disorders. *Curr Drug Targets*, **7**, 1399-1409.
- Graef, I.A., Mermelstein, P.G., Stankunas, K., Neilson, J.R., Deisseroth, K., Tsien, R.W. and Crabtree, G.R. (1999) L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature*, **401**, 703-708.
- Graef, I.A., Wang, F., Charron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M. and Crabtree, G.R. (2003) Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell*, **113**, 657-670.
- Grimes, C.A. and Jope, R.S. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*, **65**, 391-426.
- Hampton, T.G., Stasko, M.R., Kale, A., Amende, I. and Costa, A.C. (2004) Gait dynamics in trisomic mice: quantitative neurological traits of Down syndrome. *Physiol Behav*, **82**, 381-389.
- Hanger, D.P., Betts, J.C., Loviny, T.L., Blackstock, W.P. and Anderton, B.H. (1998) New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J Neurochem*, **71**, 2465-2476.
- Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P. and Anderton, B.H. (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett*, **147**, 58-62.
- Hardy, J. (2006) A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron*, **52**, 3-13.
- Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**, 353-356.
- Harwood, A.J. (2005) Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hypothesis revisited. *Mol Psychiatry*, **10**, 117-126.

- He, X., Saint-Jeannet, J.P., Woodgett, J.R., Varmus, H.E. and Dawid, I.B. (1995) Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in *Xenopus* embryos. *Nature*, **374**, 617-622.
- Hemmings, B.A., Aitken, A., Cohen, P., Rymond, M. and Hofmann, F. (1982) Phosphorylation of the type-II regulatory subunit of cyclic-AMP-dependent protein kinase by glycogen synthase kinase 3 and glycogen synthase kinase 5. *Eur J Biochem*, **127**, 473-481.
- Henriksen, E.J. and Dokken, B.B. (2006) Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr Drug Targets*, **7**, 1435-1441.
- Hernandez, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J. and Lucas, J.J. (2002) Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem*, **83**, 1529-1533.
- Hetman, M., Cavanaugh, J.E., Kimelman, D. and Xia, Z. (2000) Role of glycogen synthase kinase-3 β in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci*, **20**, 2567-2574.
- Hetman, M., Hsuan, S.L., Habas, A., Higgins, M.J. and Xia, Z. (2002) ERK1/2 antagonizes glycogen synthase kinase-3 β -induced apoptosis in cortical neurons. *J Biol Chem*, **277**, 49577-49584.
- Hirayama, I., Yi, Z., Izumi, S., Arai, I., Suzuki, W., Nagamachi, Y., Kuwano, H., Takeuchi, T. and Izumi, T. (1999) Genetic analysis of obese diabetes in the TSOD mouse. *Diabetes*, **48**, 1183-1191.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O. and Woodgett, J.R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*, **406**, 86-90.
- Hong, M., Chen, D.C., Klein, P.S. and Lee, V.M. (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*, **272**, 25326-25332.
- Hongisto, V., Smeds, N., Brecht, S., Herdegen, T., Courtney, M.J. and Coffey, E.T. (2003) Lithium blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol*, **23**, 6027-6036.
- Hooper, C., Killick, R. and Lovestone, S. (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **104**, 1433-1439.
- Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., Kondo, S., Saitoh, Y., Ishiguro, K., Hoshino, T. and Imahori, K. (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2719-2723.
- Hu, S., Begum, A.N., Jones, M.R., Oh, M.S., Beech, W.K., Beech, B.H., Yang, F., Chen, P., Ubeda, O.J., Kim, P.C., Davies, P., Ma, Q., Cole, G.M. and Frautschy, S.A. (2009) GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. *Neurobiol Dis*, **33**, 193-206.
- Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S.E., Totty, N.F. and Woodgett, J.R. (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *Embo J*, **12**, 803-808.
- Hye, A., Kerr, F., Archer, N., Foy, C., Poppe, M., Brown, R., Hamilton, G., Powell, J., Anderton, B. and Lovestone, S. (2005) Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **373**, 1-4.
- Imahori, K. and Uchida, T. (1997) Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem*, **121**, 179-188.
- Irwin, S. (1968) Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*, **13**, 222-257.

- Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T. and Imahori, K. (1993) Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett*, **325**, 167-172.
- Jayanthi, S., Deng, X., Ladenheim, B., McCoy, M.T., Cluster, A., Cai, N.S. and Cadet, J.L. (2005) Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the Fas ligand/Fas death pathway is involved in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 868-873.
- Jope, R.S. (2003) Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci*, **24**, 441-443.
- Jope, R.S. and Johnson, G.V. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*, **29**, 95-102.
- Jope, R.S. and Roh, M.S. (2006) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets*, **7**, 1421-1434.
- Kaidanovich-Beilin, O., Milman, A., Weizman, A., Pick, C.G. and Eldar-Finkelman, H. (2004) Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biol Psychiatry*, **55**, 781-784.
- Kato, T. (2008) Molecular neurobiology of bipolar disorder: a disease of 'mood-stabilizing neurons'? *Trends Neurosci*, **31**, 495-503.
- Kiani, A., Rao, A. and Aramburu, J. (2000) Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity*, **12**, 359-372.
- Klein, P.S. and Melton, D.A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8455-8459.
- Koike, H., Arguello, P.A., Kvajo, M., Karayiorgou, M. and Gogos, J.A. (2006) Disc1 is mutated in the 129S6/SvEv strain and modulates working memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3693-3697.
- Kozlovsky, N., Belmaker, R.H. and Agam, G. (2000) Low GSK-3beta immunoreactivity in postmortem frontal cortex of schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*, **157**, 831-833.
- Kuchibhotla, K.V., Goldman, S.T., Lattarulo, C.R., Wu, H.Y., Hyman, B.T. and Bacskai, B.J. (2008) Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron*, **59**, 214-225.
- Kvajo, M., McKellar, H., Arguello, P.A., Drew, L.J., Moore, H., MacDermott, A.B., Karayiorgou, M. and Gogos, J.A. (2008) A mutation in mouse Disc1 that models a schizophrenia risk allele leads to specific alterations in neuronal architecture and cognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 7076-7081.
- Lai, W.S., Xu, B., Westphal, K.G., Paterlini, M., Olivier, B., Pavlidis, P., Karayiorgou, M. and Gogos, J.A. (2006) Akt1 deficiency affects neuronal morphology and predisposes to abnormalities in prefrontal cortex functioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 16906-16911.
- Leroy, K. and Brion, J.P. (1999) Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. *J Chem Neuroanat*, **16**, 279-293.
- Leroy, K., Yilmaz, Z. and Brion, J.P. (2007) Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **33**, 43-55.
- Lewandoski, M. (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet*, **2**, 743-755.

- Li, X., Rosborough, K.M., Friedman, A.B., Zhu, W. and Roth, K.A. (2007) Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics. *Int J Neuropsychopharmacol*, **10**, 7-19.
- Lian, Q., Ladner, C.J., Magnuson, D. and Lee, J.M. (2001) Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Exp Neurol*, **167**, 158-165.
- Liang, D., Li, X. and Clark, J.D. (2004) Increased expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II alpha during chronic morphine exposure. *Neuroscience*, **123**, 769-775.
- Liao, X., Zhang, L., Thrasher, J.B., Du, J. and Li, B. (2003) Glycogen synthase kinase-3beta suppression eliminates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*, **2**, 1215-1222.
- Lim, F., Hernandez, F., Lucas, J.J., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A. and Avila, J. (2001) FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci*, **18**, 702-714.
- Linseman, D.A., Butts, B.D., Precht, T.A., Phelps, R.A., Le, S.S., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Florez-McClure, M.L. and Heidenreich, K.A. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci*, **24**, 9993-10002.
- Lochhead, P.A., Kinstrie, R., Sibbet, G., Rawjee, T., Morrice, N. and Cleghon, V. (2006) A chaperone-dependent GSK3beta transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation. *Mol Cell*, **24**, 627-633.
- Lovestone, S., Davis, D.R., Webster, M.T., Kaech, S., Brion, J.P., Matus, A. and Anderton, B.H. (1999) Lithium reduces tau phosphorylation: effects in living cells and in neurons at therapeutic concentrations. *Biol Psychiatry*, **45**, 995-1003.
- Lovestone, S., Hartley, C.L., Pearce, J. and Anderton, B.H. (1996) Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience*, **73**, 1145-1157.
- Lovestone, S., Reynolds, C.H., Latimer, D., Davis, D.R., Anderton, B.H., Gallo, J.M., Hanger, D., Mulot, S., Marquardt, B., Stabel, S. and et al. (1994) Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol*, **4**, 1077-1086.
- Lucas, J.J., Hernandez, F. and Avila, J. (1999) Nuclear localization of beta-catenin in adult mouse thalamus correlates with low levels of GSK-3beta. *Neuroreport*, **10**, 2699-2703.
- Lucas, J.J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Hen, R. and Avila, J. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J*, **20**, 27-39.
- Luo, J. (2009) Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett*, **273**, 194-200.
- MacAulay, K., Doble, B.W., Patel, S., Hansotia, T., Sinclair, E.M., Drucker, D.J., Nagy, A. and Woodgett, J.R. (2007) Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab*, **6**, 329-337.
- Macdonald, A., Briggs, K., Poppe, M., Higgins, A., Velayudhan, L. and Lovestone, S. (2008) A feasibility and tolerability study of lithium in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, **23**, 704-711.
- Macritchie, K.A.N. and Young, A.H. (2004) Adverse syndromes associated with lithium. *Haddad P, Dursun S, Deakin B (eds), Adverse syndromes & psychiatric drugs. A clinical guide. Oxford University Press*, 89-109.

- Martinez, A., Castro, A. and Medina, M. (2006) Glycogen synthase kinase- 3 (GSK-3) and its inhibitors: Drug discovery and development. *John Wiley & Sons, Inc., New Jersey*
- Manoukian, A.S. and Woodgett, J.R. (2002) Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways. *Adv Cancer Res*, **84**, 203-229.
- Mao, Y., Ge, X., Frank, C.L., Madison, J.M., Koehler, A.N., Doud, M.K., Tassa, C., Berry, E.M., Soda, T., Singh, K.K., Biechele, T., Petryshen, T.L., Moon, R.T., Haggarty, S.J. and Tsai, L.H. (2009) Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell*, **136**, 1017-1031.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L. and Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4245-4249.
- Matsuura, K., Kabuto, H., Makino, H. and Ogawa, N. (1997) Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *J Neurosci Methods*, **73**, 45-48.
- Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y.Y., Wang, L., Hawkins, R.D. and Kandel, E.R. (1996) Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science*, **274**, 1678-1683.
- Mazanetz, M.P. and Fischer, P.M. (2007) Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 464-479.
- McMahon, A.P. and Bradley, A. (1990) The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, **62**, 1073-1085.
- Meijer, L., Flajolet, M. and Greengard, P. (2004) Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 471-480.
- Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y. and Fujita, S.C. (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem*, **81**, 1073-1083.
- Munoz-Montano, J.R., Lim, F., Moreno, F.J., Avila, J. and Diaz-Nido, J. (1999) Glycogen Synthase Kinase-3 Modulates Neurite Outgrowth in Cultured Neurons: Possible Implications for Neurite Pathology in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, **1**, 361-378.
- Munoz-Montano, J.R., Moreno, F.J., Avila, J. and Diaz-Nido, J. (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett*, **411**, 183-188.
- Nadri, C., Dean, B., Scarr, E. and Agam, G. (2004) GSK-3 parameters in postmortem frontal cortex and hippocampus of schizophrenic patients. *Schizophr Res*, **71**, 377-382.
- Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancois, J., Feinstein, B., Burns, M., Krishnamurthy, P., Wen, Y., Bhat, R., Lewis, J., Dickson, D. and Duff, K. (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6990-6995.
- O'Brien, W.T., Harper, A.D., Jove, F., Woodgett, J.R., Maretto, S., Piccolo, S. and Klein, P.S. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci*, **24**, 6791-6798.
- Ortega, Z., Diaz-Hernandez, M. and Lucas, J.J. (2007) Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington's disease? *Cell Mol Life Sci*, **64**, 2245-2257.
- Ougolkov, A.V., Bone, N.D., Fernandez-Zapico, M.E., Kay, N.E. and Billadeau, D.D. (2007) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic

- silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, **110**, 735-742.
- Pap, M. and Cooper, G.M. (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*, **273**, 19929-19932.
- Parker, P.J., Caudwell, F.B. and Cohen, P. (1983) Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo. *Eur J Biochem*, **130**, 227-234.
- Pastorino, J.G., Shulga, N. and Hoek, J.B. (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 7610-7618.
- Patapoutian, A. and Reichardt, L.F. (2000) Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 392-399.
- Pearce, N.J., Arch, J.R., Clapham, J.C., Coghlan, M.P., Corcoran, S.L., Lister, C.A., Llano, A., Moore, G.B., Murphy, G.J., Smith, S.A., Taylor, C.M., Yates, J.W., Morrison, A.D., Harper, A.J., Roxbee-Cox, L., Abuin, A., Wargent, E. and Holder, J.C. (2004) Development of glucose intolerance in male transgenic mice overexpressing human glycogen synthase kinase-3beta on a muscle-specific promoter. *Metabolism*, **53**, 1322-1330.
- Pei, J.J., Tanaka, T., Tung, Y.C., Braak, E., Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. (1997) Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 70-78.
- Peineau, S., Taghibiglou, C., Bradley, C., Wong, T.P., Liu, L., Lu, J., Lo, E., Wu, D., Saule, E., Bouschet, T., Matthews, P., Isaac, J.T., Bortolotto, Z.A., Wang, Y.T. and Collingridge, G.L. (2007) LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron*, **53**, 703-717.
- Peter, M.E. and Krammer, P.H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*, **10**, 26-35.
- Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M. and Klein, P.S. (2003) GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*, **423**, 435-439.
- Plyte, S.E., Hughes, K., Nikolakaki, E., Pulverer, B.J. and Woodgett, J.R. (1992) Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta*, **1114**, 147-162.
- Polakis, P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, **14**, 1837-1851.
- Rao, A., Luo, C. and Hogan, P.G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, **15**, 707-747.
- Rogers, D.C., Fisher, E.M., Brown, S.D., Peters, J., Hunter, A.J. and Martin, J.E. (1997) Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome*, **8**, 711-713.
- Roh, M.S., Seo, M.S., Kim, Y., Kim, S.H., Jeon, W.J., Ahn, Y.M., Kang, U.G., Juhnn, Y.S. and Kim, Y.S. (2007) Haloperidol and clozapine differentially regulate signals upstream of glycogen synthase kinase 3 in the rat frontal cortex. *Exp Mol Med*, **39**, 353-360.
- Ross, C.A., Margolis, R.L., Reading, S.A., Pletnikov, M. and Coyle, J.T. (2006) Neurobiology of schizophrenia. *Neuron*, **52**, 139-153.
- Rottmann, S., Wang, Y., Nasoff, M., Deveraux, Q.L. and Quon, K.C. (2005) A TRAIL receptor-dependent synthetic lethal relationship between MYC activation and GSK3beta/FBW7 loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15195-15200.
- Ruel, L., Bourouis, M., Heitzler, P., Pantesco, V. and Simpson, P. (1993) Drosophila shaggy kinase and rat glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch. *Nature*, **362**, 557-560.

- Ruel, L., Stambolic, V., Ali, A., Manoukian, A.S. and Woodgett, J.R. (1999) Regulation of the protein kinase activity of Shaggy(Zeste-white3) by components of the wingless pathway in Drosophila cells and embryos. *J Biol Chem*, **274**, 21790-21796.
- Ryder, J., Su, Y., Liu, F., Li, B., Zhou, Y. and Ni, B. (2003) Divergent roles of GSK3 and CDK5 in APP processing. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 922-929.
- Rylatt, D.B., Aitken, A., Bilham, T., Condon, G.D., Embi, N. and Cohen, P. (1980) Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, **107**, 529-537.
- Ryves, W.J. and Harwood, A.J. (2001) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 720-725.
- Sanchez, C., Perez, M. and Avila, J. (2000) GSK3 β -mediated phosphorylation of the microtubule-associated protein 2C (MAP2C) prevents microtubule bundling. *Eur J Cell Biol*, **79**, 252-260.
- Sanchez, S., Sayas, C.L., Lim, F., Diaz-Nido, J., Avila, J. and Wandosell, F. (2001) The inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3. *J Neurochem*, **78**, 468-481.
- Schreiber, S.L. and Crabtree, G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today*, **13**, 136-142.
- Shastry, B.S. (2005) Bipolar disorder: an update. *Neurochem Int*, **46**, 273-279.
- Simon, D., Benitez, M.J., Gimenez-Cassina, A., Garrido, J.J., Bhat, R.V., Diaz-Nido, J. and Wandosell, F. (2008) Pharmacological inhibition of GSK-3 is not strictly correlated with a decrease in tyrosine phosphorylation of residues 216/279. *J Neurosci Res*, **86**, 668-674.
- Soli, A.H., Kahn, C.R., Neville, D.M., Jr. and Roth, J. (1975) Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity. *J Clin Invest*, **56**, 769-780.
- Sone, H., Suzuki, H., Takahashi, A. and Yamada, N. (2001) Disease model: hyperinsulinemia and insulin resistance. Part A-targeted disruption of insulin signaling or glucose transport. *Trends Mol Med*, **7**, 320-322.
- Song, L., De Sarno, P. and Jope, R.S. (2002) Central role of glycogen synthase kinase-3 β in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation. *J Biol Chem*, **277**, 44701-44708.
- Song, L., Zhou, T. and Jope, R.S. (2004) Lithium facilitates apoptotic signaling induced by activation of the Fas death domain-containing receptor. *BMC Neurosci*, **5**, 20.
- Stambolic, V., Ruel, L. and Woodgett, J.R. (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*, **6**, 1664-1668.
- Stambolic, V. and Woodgett, J.R. (1994) Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 β in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J*, **303 (Pt 3)**, 701-704.
- Sun, M., Song, L., Li, Y., Zhou, T. and Jope, R.S. (2008) Identification of an antiapoptotic protein complex at death receptors. *Cell Death Differ*, **15**, 1887-1900.
- Sun, X., Sato, S., Murayama, O., Murayama, M., Park, J.M., Yamaguchi, H. and Takashima, A. (2002) Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100. *Neurosci Lett*, **321**, 61-64.
- Sutton, L.P., Honardoust, D., Mouyal, J., Rajakumar, N. and Rushlow, W.J. (2007) Activation of the canonical Wnt pathway by the antipsychotics haloperidol and clozapine involves dishevelled-3. *J Neurochem*, **102**, 153-169.

- Takahashi, M., Tomizawa, K., Kato, R., Sato, K., Uchida, T., Fujita, S.C. and Imahori, K. (1994) Localization and developmental changes of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat brain. *J Neurochem*, **63**, 245-255.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S. and Wolozin, B. (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9637-9641.
- Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T. and Imahori, K. (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7789-7793.
- Takashima, A., Yamaguchi, H., Noguchi, K., Michel, G., Ishiguro, K., Sato, K., Hoshino, T., Hoshi, M. and Imahori, K. (1995) Amyloid beta peptide induces cytoplasmic accumulation of amyloid protein precursor via tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, **198**, 83-86.
- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S. and et al. (1994) Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, **372**, 182-186.
- Voisine, C., Varma, H., Walker, N., Bates, E.A., Stockwell, B.R. and Hart, A.C. (2007) Identification of potential therapeutic drugs for huntington's disease using *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, **2**, e504.
- Wang, Q.M., Fiol, C.J., DePaoli-Roach, A.A. and Roach, P.J. (1994) Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem*, **269**, 14566-14574.
- Weihl, C.C., Ghadge, G.D., Kennedy, S.G., Hay, N., Miller, R.J. and Roos, R.P. (1999) Mutant presenilin-1 induces apoptosis and downregulates Akt/PKB. *J Neurosci*, **19**, 5360-5369.
- Welsh, G.I., Miller, C.M., Loughlin, A.J., Price, N.T. and Proud, C.G. (1998) Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett*, **421**, 125-130.
- Welsh, G.I. and Proud, C.G. (1993) Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J*, **294 (Pt 3)**, 625-629.
- Wong, P.C., Cai, H., Borchelt, D.R. and Price, D.L. (2002) Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*, **5**, 633-639.
- Wood, N.I. and Morton, A.J. (2003) Chronic lithium chloride treatment has variable effects on motor behaviour and survival of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Res Bull*, **61**, 375-383.
- Woodgett, J.R. (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J*, **9**, 2431-2438.
- Xie, H., Litersky, J.M., Hartigan, J.A., Jope, R.S. and Johnson, G.V. (1998) The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association. *Brain Res*, **798**, 173-183.
- Yamamoto, A., Lucas, J.J. and Hen, R. (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell*, **101**, 57-66.
- Young, A.H. and Newham, J.I. (2006) Lithium in maintenance therapy for bipolar disorder. *J Psychopharmacol*, **20**, 17-22.
- Zeng, L.H., Xu, L., Rensing, N.R., Sinatra, P.M., Rothman, S.M. and Wong, M. (2007) Kainate seizures cause acute dendritic injury and actin depolymerization in vivo. *J Neurosci*, **27**, 11604-11613.

- Zhang, F., Piel, C.J., Spece, L., Gurvich, N. and Klein, P.S. (2003) Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem*, **278**, 33067-33077.

ANEXO

Relación de publicaciones de la doctoranda

Engel, T., Hernández, F., **Gómez-Sintes, R.**, Avila, J. and Lucas, J.J. (2006) "Animal models with modified expression of GSK-3 for the study of its physiology and of its implications in human pathologies". In: *Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) and its inhibitors*. Martinez, A. Castro and M. Medina Eds. Wiley-Interscience pp: 209-219.

Gómez-Sintes, R., Hernandez, F., Bortolozzi, A., Artigas, F., Avila, J., Zaratini, P., Gotteland, J.P., and Lucas, J.J. 2007. Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominant-negative GSK-3 conditional transgenic mice. *Embo J* 26:2743-2754.

Gómez-Sintes, R. and Lucas J.J. NFAT/Fas-mediated neuronal-apoptosis underlies the neurological side-effects of GSK-3-inhibition in a mouse model of lithium therapy. Enviado a publicación a *Journal of Clinical Investigation*.

Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominant-negative GSK-3 conditional transgenic mice

Raquel Gómez-Sintes¹, Félix Hernández¹,
Analía Bortolozzi², Francesc Artigas²,
Jesús Avila¹, Paola Zaratin³, Jean Pierre
Gotteland⁴ and José J Lucas^{1,*}

¹Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’, CSIC/UAM, Madrid, Spain, ²Departamento de Neuroquímica y Neurofarmacología, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (CSIC), IDIBAPS, Barcelona, Spain, ³Istituto di Ricerche Biomediche ‘A. Marxer’, LCG-RBM/Serono Discovery, Colletterto Giacosa, Italy and ⁴Merck Serono International, Geneva, Switzerland

Increased glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) activity is believed to contribute to the etiology of chronic disorders like Alzheimer’s disease and diabetes, thus supporting therapeutic potential of GSK-3 inhibitors. However, sustained GSK-3 inhibition might induce tumorigenesis through β -catenin-APC dysregulation. Besides, sustained *in vivo* inhibition by genetic means (constitutive knock-out mice) revealed unexpected embryonic lethality due to massive hepatocyte apoptosis. Here, we have generated transgenic mice with conditional (tetracycline system) expression of dominant-negative-GSK-3 as an alternative genetic approach to predict the outcome of chronic GSK-3 inhibition, either *per se*, or in combination with mouse models of disease. By choosing a postnatal neuron-specific promoter, here we specifically address the neurological consequences. Tet/DN-GSK-3 mice showed increased neuronal apoptosis and impaired motor coordination. Interestingly, DN-GSK-3 expression shut-down restored normal GSK-3 activity and re-established normal incidence of apoptosis and motor coordination. These results reveal the importance of intact GSK-3 activity for adult neuron viability and physiology and warn of potential neurological toxicity of GSK-3 pharmacological inhibition beyond physiological levels. Interestingly, the reversibility data also suggest that unwanted side effects are likely to revert if excessive GSK-3 inhibition is halted.

The EMBO Journal (2007) 26, 2743–2754. doi:10.1038/sj.emboj.7601725; Published online 17 May 2007

Subject Categories: neuroscience

Keywords: apoptosis; conditional; dominant negative; GSK-3; transgenic

Introduction

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is a serine/threonine kinase that is present in most tissues and that is particularly abundant in the central nervous system (CNS) (Woodgett, 1990). There are two isoforms of the enzyme termed GSK-3 α and GSK-3 β that are encoded by two different genes (Woodgett, 1990). GSK-3 is known to participate in multiple signaling pathways coupled to receptors for a variety of signaling molecules such as insulin or wnt among many others (Jope and Johnson, 2004). Regulation of GSK-3 is characterized by the fact that the enzyme is active in resting conditions with activation of the different signaling pathways, leading to GSK-3 inhibition by its phosphorylation on the Ser21 or Ser9 residue of GSK-3 α and GSK-3 β , respectively (Grimes and Jope, 2001). GSK-3 phosphorylation substrates include cytoskeletal proteins, transcription factors, and metabolic regulators, thus leading to a prominent role of GSK-3 in cellular architecture, gene expression, cell division and fate decision, and apoptosis among others (Grimes and Jope, 2001; Jope and Johnson, 2004).

Aberrantly increased GSK-3 activity is believed to play a key role in the pathogenesis of chronic metabolic disorders like type-II diabetes (Eldar-Finkelman, 2002), as well as of CNS conditions such as mood disorders and Alzheimer’s disease (Avila *et al*, 2004; Jope and Johnson, 2004). With regard to GSK-3 and neurodegeneration, increased GSK-3 activity has been reported to result in neuronal apoptosis and GSK-3 inhibitors have been shown to exert antiapoptotic and neuro-protective effects in many different cell and mouse models (Pap and Cooper, 1998; Hetman *et al*, 2000; Beurel and Jope, 2006). Accordingly, potent and specific GSK-3 inhibitors are currently under development in view of their therapeutic potential (Cohen and Goedert, 2004; Frame and Zheleva, 2006; Gould *et al*, 2006). However, there are two main concerns that counteract the predicted usefulness of GSK-3 inhibitor therapies. On the one hand, the prominent role of GSK-3 in the adenomatous polyposis coli (APC)– β -catenin destruction complex implies that inhibition of GSK-3 could possibly lead to tumor promotion through the activation of β -catenin (Polakis, 2000). On the other hand, despite the above mentioned predicted antiapoptotic effect of GSK-3 inhibition, *in vivo* sustained inhibition by genetic means (constitutive knock-out mice) revealed an unexpected embryonic lethality due to massive hepatocyte apoptosis (Hoeflich *et al*, 2000). In this regard, pharmacological inhibition of GSK-3 in cell lines has also been shown to facilitate apoptosis triggered by certain stimuli (Beyaert *et al*, 1989; Song *et al*, 2004; Beurel and Jope, 2006).

In order to explore the consequences of sustained GSK-3 inhibition in adult tissues, here we have generated transgenic mice carrying a transgene encoding a dominant negative (DN) form of GSK-3 β (DN-GSK-3) under control of

*Corresponding author. Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’, CSIC/UAM, Campus UAM de Cantoblanco, Madrid 28049, Spain.
Tel.: +34 91 497 3595/8073; Fax: +34 91 497 8087;
E-mail: jjlucas@cbm.uam.es

Received: 21 November 2006; accepted: 24 April 2007; published online: 17 May 2007

a tetracycline-controlled conditional promoter. Due to the binary nature of the conditional transgenic system, these mice become a powerful tool because transgene transactivation can be directed to different tissues upon crossing with any of the available driver mice that express tTA (Tet-Off) under control of different promoters (Lewandoski, 2001).

To specifically address the neurological consequences of a sustained decrease in GSK-3 activity, we used driver mice with postnatal neuron-specific expression (CamKII-tTA mice; Mayford *et al*, 1996). Here, we report that sustained expression of DN-GSK-3 in the resulting double transgenic mice (Tet/DN-GSK-3 mice) leads to decreased GSK-3 activity and concomitant decreased phosphorylation of the microtubule-associated protein tau, a well-characterized GSK-3 substrate. Interestingly, Tet/DN-GSK-3 mice grew normally and no evidence of tumor formation was obtained either after gross anatomical examination or after analysis of brain morphology. However, apoptosis was detected in Tet/DN-GSK-3 mice in brain regions involved in motor control. Accordingly, Tet/DN-GSK-3 mice also showed a behavioral deficit in motor coordination. Finally, DN-GSK-3 transgene shutdown by doxycycline administration resulted in normal GSK-3 activity and in full reversal of the motor and of the neuronal apoptosis phenotypes.

Results

Mouse design

Constitutive knock-out of GSK-3 β in mice is known to result in embryonic lethality (Hoeftlich *et al*, 2000). As an alternative genetic approach to explore the consequences of a sustained decrease in GSK-3 activity in adult tissues, we decided to generate mice with conditional transgenic expression of a dominant-negative (DN) form of GSK-3. More precisely, the K85R mutant form of GSK-3 β (DN-GSK-3) was chosen in view of its previously shown efficacy in decreasing GSK-3 activity (Dominguez *et al*, 1995).

The tetracycline-regulated system can be used for conditional gene expression in mice (Gingrich and Roder, 1998; Lewandoski, 2001). By using this system, we have previously generated inducible mouse models of neurodegenerative diseases (Yamamoto *et al*, 2000; Lucas *et al*, 2001). Similarly, here we decided to generate mice with the DN-GSK-3 transgene linked to a tetracycline responsive (tetO) promoter (Figure 1A). These mice can then be bred with mice with tissue-specific expression of the tetracycline transactivator (tTA, also known as Tet-Off). Then, double transgenic mice will express DN-GSK-3 in a tetracycline-repressible manner (Figure 1B). There are many available mouse lines expressing tTA (Lewandoski, 2001). Here, we aimed to explore the neurological consequences of sustained GSK-3 inhibition by using mice that express tTA under control of a postnatal neuron-specific promoter (Cam-KII-tTA mice; Mayford *et al*, 1996).

To generate the DN-GSK-3 construct for transgenesis, the sequence of the K85R mutant form of GSK-3 β was cloned into a cassette containing the bidirectional tetO (Bi-tetO) promoter linked to a β -galactosidase (β -gal) reporter in divergent orientation (Figure 1A). Our previous experience in generating conditional transgenic mice with the tet-regulated system indicates that the site of insertion and/or the copy number of the tetO construct influences the final pattern and level of

transactivation by tTA (Yamamoto *et al*, 2000; Lucas *et al*, 2001). The β -gal reporter sequence in the DN-GSK-3 construct permits, on one hand, a quick analysis of the pattern of transgene expression in the double transgenic (Tet/DN-GSK-3) mice from the different founder lines by X-gal staining or by immunohistochemistry against β -gal. On the other hand, it also allows to test the efficiency of transgene silencing after tetracycline administration (Yamamoto *et al*, 2000; Diaz-Hernandez *et al*, 2005; Engel *et al*, 2006).

Generation of mice with conditional expression of DN-GSK-3 in forebrain neurons

Four independent transgenic mouse founder lines were obtained that carried the DN-GSK-3 construct and they were termed R1, R2, R3 and R4 (Figure 1B). To study the effect of sustained GSK-3 inhibition in adult neurons, these mouse lines were then bred with the Cam-KII-tTA mouse line. In good agreement with the postnatal nature of the driver neuronal promoter, the percentage of double transgenic mice was close to the expected 25% for all founder lines (R1: 29/151, R2: 56/177, R3: 37/167, R4: 54/200 in the first analyzed litters).

The level and pattern of expression of the reporter transgene β -gal was then analyzed in 2-month-old Tet/DN-GSK-3 mice by Western blot and by immunohistochemistry. Tet/DN-GSK-3 mice resulting from line R3 showed the lowest level of transactivation by Western blot (Figure 1C) and, as evidenced by immunohistochemistry, this was restricted to the ventral striatum (data not shown). Lines R1, R2 and R4, on the other hand, led to β -gal expression in a spatial pattern very similar to that of endogenous CamKII α , with expression evident in cortex, hippocampus, striatum, amygdala, and olfactory bulb neurons (Figure 1C–F and data not shown). Since CamKII α is known to be expressed to a lesser extent in spinal cord (Liang *et al*, 2004), we also analyzed this structure, but no expression was detected either by Western blot, immunohistochemistry, or X-Gal staining (Supplementary Figure 1). Similarly and as expected, no transgene expression was detected in other brain regions with no expression of CamKII α , such as cerebellum, brainstem, or thalamus nor in peripheral tissues (Supplementary Figure 1 and data not shown). Expression was highest in the striatum, where the vast majority of neurons showed transgene expression (Figure 1C and D). On the other hand, in the cortex and in the hippocampus, expression was restricted to certain neuronal subpopulations (Figure 1E and F). More precisely, cortical expression was located mainly in layer II–III neurons and hippocampal expression was essentially restricted to neurons in the CA1 field. In good agreement with the β -gal immunohistochemistry data, striatum was the only analyzed brain region, where increased total GSK-3 β (endogenous plus transgenic DN-GSK-3 β ; 0.9 fold increase, $P < 0.05$) was detected by Western blot (Figure 2A), and where some neurons expressed DN-GSK-3 β above threshold for detection by immunofluorescence with anti-myc antibody (data not shown). Since R1, R2, and R4 Tet/DN-GSK-3 mice gave a similar pattern and level of transactivation, the three lines were analyzed in parallel. For all the biochemical, histological, and behavioral determinations, the three lines exhibited very similar phenotypes and we will refer to them indistinguishably as Tet/DN-GSK-3 mice.

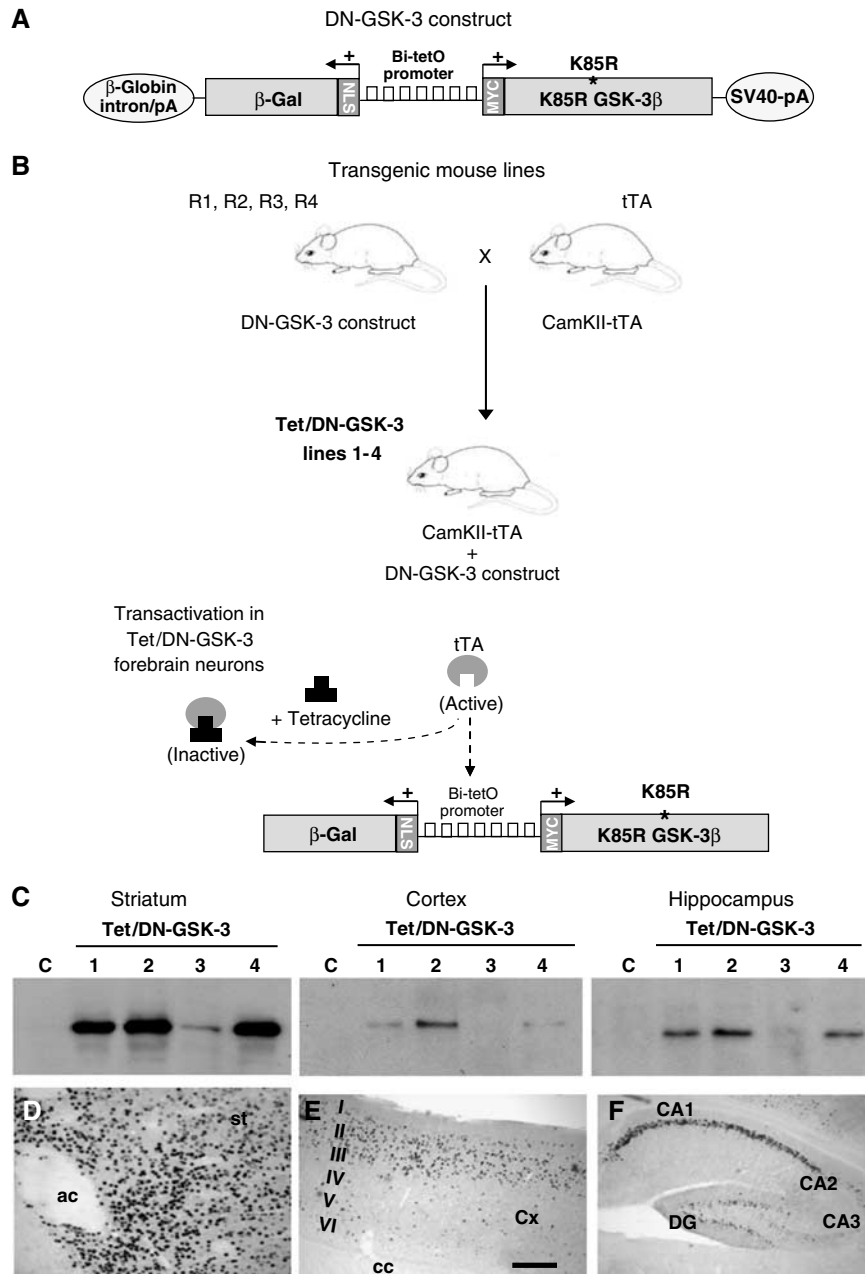


Figure 1 Generation of Tet/DN-GSK-3 mice and mapping of transgene expression. (A) Diagram showing the structure of the DN-GSK-3 construct used for transgenesis. The bidirectional Bi-tetO promoter is followed in one direction by the K85R-GSK-3β (DN-GSK-3) cDNA sequence with a myc epitope, and by the β-galactosidase (β-gal) sequence with a nuclear localization signal (NLS) in the other direction. (B) Generation of the conditional transgenic Tet/DN-GSK-3 mice (lines 1–4) by breeding the four DN-GSK-3 founder mice (R1, R2, R3 and R4 mice) with mice expressing tTA under control of the CamKIIα promoter (tTA mice). (C) Western blot detection of β-gal in striatum, cortex and hippocampus of 2-month-old Tet/DN-GSK-3 (R1, R2, R3 or R4) mice and control mice. (D–F) β-gal immunohistochemistry on sagittal brain sections from a 2-month-old Tet/DN-GSK-3 mouse (line 2). (D) striatum, (E) cortex and (F) hippocampus. ac, anterior commissure; Cx, cortex, I–VI, cortical layers; cc, corpus callosum; DG, dentate gyrus. Scale bar in panel E corresponds to 300 μm in panels (E, F), and to 200 μm in panel (D).

Tet/DN-GSK-3 mice grew normally and they showed no differences in body weight with respect to their wild-type littermates. Tet/DN-GSK-3 mice also showed a normal lifespan and no evidence of tumor formation was obtained either after gross anatomical examination or after analysis of brain morphology.

Reduced GSK-3 activity in the striatum of Tet/DN-GSK-3 mice

To verify that the forebrain expression of DN-GSK-3 resulted in decreased GSK-3 activity, we performed GSK-3 enzymatic

activity assays on brain lysates as well as Western blot determination of the phosphorylated forms of GSK-3 and of its well-established substrate tau. In good agreement with the fact that striatum was the brain region with the highest level of transgene expression, GSK-3 activity was significantly reduced on striatal homogenates of Tet/DN-GSK-3 mice compared with those of wild-type mice (Figure 2B). A tendency toward decreased activity was observed also in cortical and hippocampal homogenates, but this did not reach statistical significance (Figure 2B).

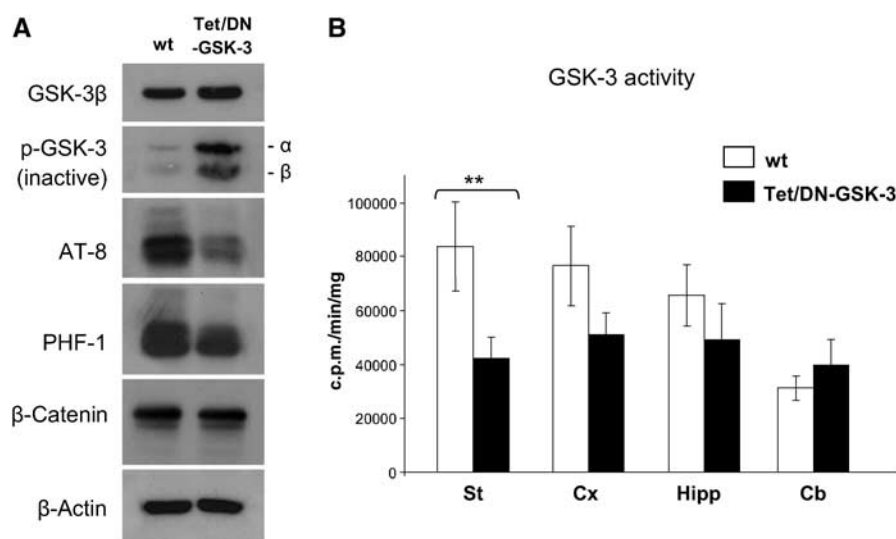


Figure 2 Decreased GSK-3 activity in Tet/DN-GSK-3 mice. (A) Western blot detection of GSK-3β, phosphorylated GSK-3 (pSer^{21/9} GSK-3α/β), AT-8 and PHF-1 phospho-tau epitopes, and β-catenin levels in homogenates from striatum of Tet/DN-GSK-3 mice and wild-type (wt) littermates. (B) *In vitro* GSK-3 activity assay performed on striatum, cortex, hippocampus and cerebellum homogenates from Tet/DN-GSK-3 mice and wt littermates (***P* < 0.001).

Similarly, no decrease was observed in non-expressing brain regions such as cerebellum.

We then analyzed by Western blot the striatal level of the inactive forms of GSK-3 that results from phosphorylation on Ser9 of the β isoform and on Ser21 of the α isoform (p-GSK-3) (Figure 2A). Interestingly, expression of DN-GSK-3β resulted in a dramatic increase (3.2-fold, *P* < 0.001) not only in phospho-Ser9-GSK-3β but also in phospho-Ser21-GSK-3α. Since total GSK-3α levels are not altered in Tet/DN-GSK-3 mice (data not shown), this strongly suggests that the observed net reduction in GSK-3 activity is probably due in part to the previously reported mechanism that amplifies GSK-3 inhibition (Joep, 2003; Zhang *et al*, 2003). This mechanism is based on increased phosphorylation at the Ser21/9 residues in response to sustained inhibition of GSK-3 either by pharmacological or genetic means, even if the latter is performed in a single isoform (e.g. GSK-3β knock-out fibroblasts; Hoeflich *et al*, 2000). A moderate increase in the levels of inactive Ser21/9 phospho-GSK-3 was also observed by Western blot in the other two analyzed transgene expressing brain regions, hippocampus, and cortex. However, as for the GSK-3 activity assay data, the cortical and hippocampal increases in Ser21/9 phospho-GSK-3 did not reach statistical significance after normalizing for total GSK-3 levels (data not shown). In good agreement with the marked striatal decrease in GSK-3 activity, the level of phosphorylation of tau was reduced in striatal homogenates of Tet/DN-GSK-3 mice. This was evidenced by Western blot with the AT-8 (72% reduction, *P* < 0.01) and the PHF-1 (46% reduction, *P* < 0.01), antibodies (Figure 2A) that recognize two independent phospho-epitopes that are known to be phosphorylated by GSK-3 (Lovestone *et al*, 1994). We also analyzed the level of β-catenin that is also a GSK-3 substrate. Since β-catenin phosphorylation by GSK-3 favors its degradation by the proteasome (Aberle *et al*, 1997), we reasoned that its levels might be increased in Tet/DN-GSK-3 mice. However, as shown in Figure 2A, β-catenin levels were not changed in these mice.

We then explored by immunofluorescence the tissue distribution of the detected decrease in tau phosphorylation (Supplementary Figure 2). As expected, given the axonal localization of tau, the decrease in phospho-tau staining occurs diffusely throughout the striatal neuropil. This strongly suggests that the decrease takes place predominantly in the axons of medium size spiny neurons, that represent more than 90% of the neurons in the striatum (see staining with the DARPP-32 marker in Supplementary Figure 2B and E) and that have long axons that project outside the striatum. However, the somas of few large interneurons were also detected by PHF-1 immunofluorescence and the intensity of this staining was diminished in Tet/DN-GSK-3 mice (Supplementary Figure 2A, D, G, and I). By double labeling immunofluorescence we were able to identify these neurons as a subset of the choline acetyltransferase (ChAT)-positive large interneurons (Supplementary Figure 2G–J). In summary, decreased tau phosphorylation seems to take place mainly in the axons of medium size spiny neurons and also in a subset of ChAT-positive large interneurons.

Apoptosis detection in the striatum and cortex of Tet/DN-GSK-3 mice

Since apoptosis of liver cells was the most prominent phenotype in GSK-3β knock-out mice (Hoeflich *et al*, 2000), we wondered whether expression of DN-GSK-3 in neurons of Tet/DN-GSK-3 mice might also result in apoptosis. In this regard, although no obvious atrophy takes place in the brain of Tet/DN-GSK-3 mice, in immunofluorescence experiments we observed that some myc-positive neurons showed fragmented nuclei (not shown). To explore in a quantitative manner the incidence of neuronal apoptosis in the forebrain of Tet/DN-GSK-3 mice, we performed cleaved caspase-3 and TUNEL stainings. As anticipated, Tet/DN-GSK-3 mice showed a marked increase in the number of cleaved caspase-3-positive cells in the striatum (Figure 3B–D). Although decreased enzymatic activity was detected only in the striatum, we also analyzed apoptosis in the other brain regions with

robust transgene expression (cortex and hippocampus), because apoptosis might take place in specific neuronal subpopulations that show relatively higher expression of the transgene and/or that are particularly vulnerable to apoptosis triggered by decreased GSK-3 activity. In fact, the number of cleaved caspase-3 positive cells was also significantly increased in the cortex of Tet/DN-GSK-3 mice (Figure 3A and D). As expected, this takes place in the external layers (Figure 3A), where transgene expressing neurons are located (see Figure 1E). No significant difference in the number of cleaved caspase-3-positive cells was detected in the hippocampus or in non-expressing regions such as cerebellum (Figure 3D). Besides, we performed double immunofluorescence experiments that confirmed that caspase-3-positive cells were also detected with anti β -gal (Figure 3E and F) and with anti-Neu-N (not shown) antibodies, thus proving that the detected dying cells are transgene expressing neurons. Similar results were obtained with TUNEL staining (Figure 3G and H).

Tet/DN-GSK-3 mice show reduced motor coordination

The striatum and the cerebral cortex, the brain regions where increased apoptosis was detected in Tet/DN-GSK-3 mice, are

part of the basal ganglia circuit involved in motor control. For this reason we decided to analyze Tet/DN-GSK-3 mice in various tests of motor coordination. We first analyzed the Tet/DN-GSK-3 mice in the rotarod apparatus (Figure 4A–C). After pretraining of mice at constant speed, the rotarod was set to accelerate from 4 to 40 r.p.m. over 5 min and mice were tested four times at 1-h intervals. As shown in Figure 4A, Tet/DN-GSK-3 mice showed a marked deficit in the three first accelerating trials. On average, across the four tests, only $38.6 \pm 4.6\%$ of Tet/DN-GSK-3 mice versus $58.8 \pm 4.1\%$ of the wild-type mice remained on rod when it reached maximal speed (Figure 4B), and the total time on rod was 262.1 ± 12.2 s for wild type and 187.66 ± 13.4 s for Tet/DN-GSK-3 mice ($P < 0.007$; Figure 4C). The motor coordination deficit in Tet/DN-GSK-3 mice was confirmed in the vertical pole test that measures the time needed to descend along a rough-surfaced pole and detects striatal-dependent motor deficits (Matsuura *et al*, 1997). As shown in Figure 4D, Tet/DN-GSK-3 mice required almost double amount of time to descend as compared with the wild-type mice (43.15 ± 9.44 versus 25.36 ± 3.62 s; $P < 0.03$). We then performed analysis of stride length in the footprint test. As shown, in Figure 4E, Tet/DN-GSK-3 mice also showed a reduction in stride length

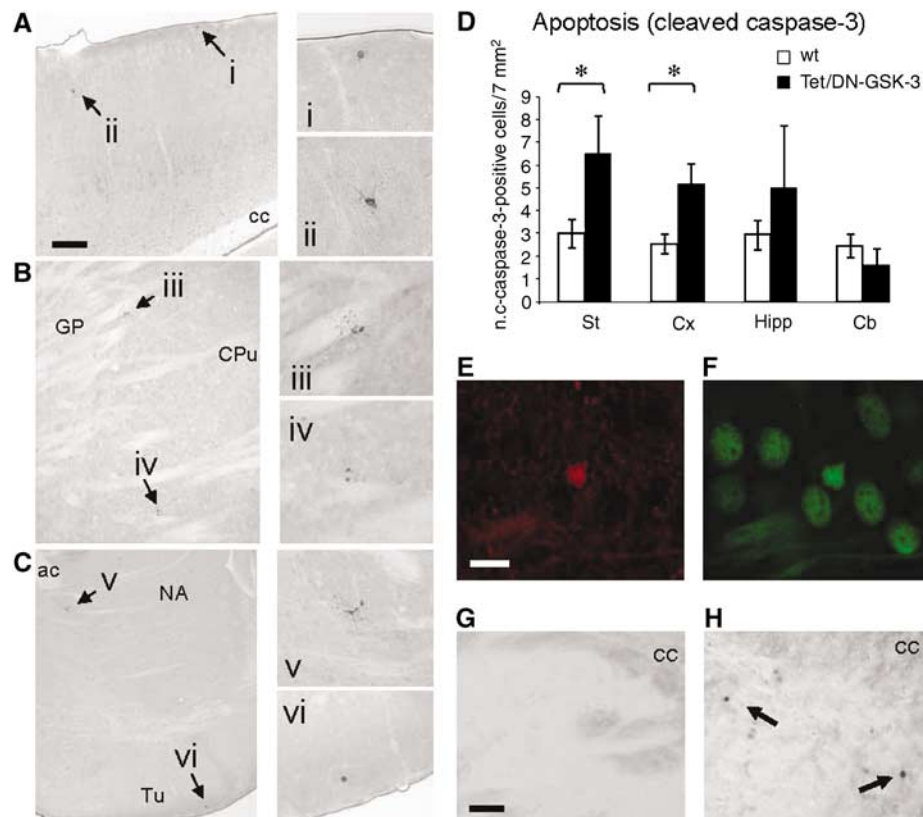


Figure 3 Apoptosis detection in striatum and cortex of Tet/DN-GSK-3 mice. (A–D) Immunohistochemical detection and quantification of cleaved caspase-3-positive cells. (A–C) Low-magnification pictures of showing cleaved caspase-3-positive cells (indicated by arrows) in cortex (A), dorsal striatum (B) and ventral striatum (C) of a Tet/DN-GSK-3 mouse. (i–vi) Magnifications of the cleaved caspase-3-positive cells shown in panels (A–C). Scale bar in panel (A) corresponds to 200 μ m in panels (A–C). (D) Histogram showing the incidence of cleaved caspase-3 immunopositive cells in striatum, cortex, hippocampus and cerebellum of Tet/DN-GSK-3 mice and their wild-type (wt) littermates. Data are presented as the mean \pm s.e.m. number of immunopositive cells per 7 mm² in a 30 μ m section ($n = 9$, $*P < 0.05$). (E–F) Double labeling immunofluorescence with anti-cleaved caspase-3 (E) and anti- β -gal (F) antibodies in the striatum of a Tet/DN-GSK-3 mouse. Scale bar in panel (E) corresponds to 10 μ m in panels (E and F). (G, H) TUNEL staining in the striatum of a wt (G) and of a Tet/DN-GSK-3 (H) mouse. Scale bar in panel (G) corresponds to 80 μ m in panels (G, H); cc, corpus callosum; GP, globus pallidus; CPu, caudate putamen; ac, anterior commissure; NA, nucleus accumbens; Tu, olfactory tubercle.

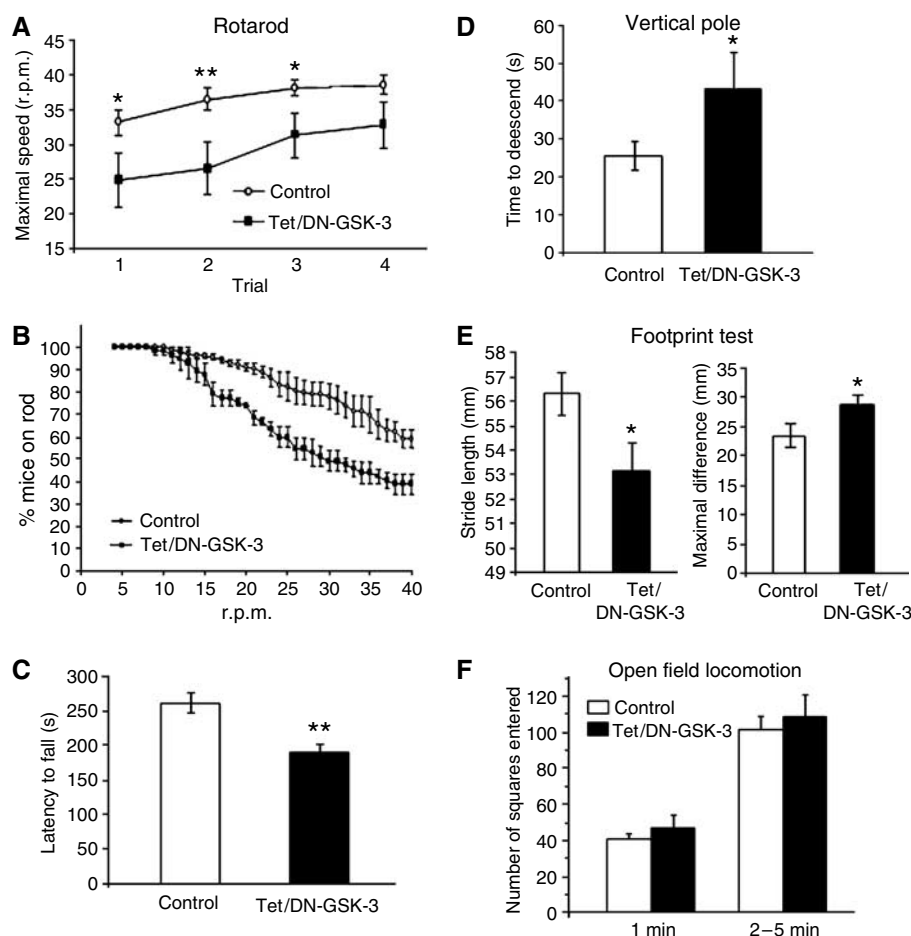


Figure 4 Tet/DN-GSK-3 mice show impaired motor coordination. Motor behavior tests were performed on 3-month-old control and Tet/DN-GSK-3 mice. (A–C) Rotarod. (A) Performance in the four accelerating trials. (B) Average percentage of mice staying on rod in the four trials as the rod accelerates. (C) Histogram showing the mean \pm s.e.m. latencies to fall from rod in the four trials per genotype ($*P < 0.05$). (D) Time to descend in the vertical pole test ($*P < 0.03$). (E) Average stride length ($*P < 0.03$) and maximal difference in stride length ($*P < 0.02$) in the footprint test. (F) Open field locomotion test. The number of squares entered was counted during the 5 min testing period. Performance in the first minute is also depicted to distinguish the effect of the transferal arousal from the total activity.

(56.31 ± 0.87 versus 53.17 ± 1.07 mm; $P < 0.03$) and higher maximal difference on stride length (23.56 ± 1.95 versus 28.82 ± 1.41 mm; $P < 0.02$), thus further demonstrating a deficit in motor coordination. Finally, to confirm the specificity of the observed motor coordination deficit, we analyze the general motor activity of Tet/DN-GSK-3 mice in the open field test (Figure 4A). Interestingly, no difference between control and Tet/DN-GSK-3 mice was observed either during the first minute (transferal arousal) or in the rest of the testing session.

Reduced dopamine-dependent behavior in Tet/DN-GSK-3 mice

The motor deficit in Tet/DN-GSK-3 mice might be explained at least in part by the increased incidence of apoptosis in basal ganglia regions, cortex and striatum. On the other hand, dopamine (DA) neurotransmission from midbrain to the striatum is a key determinant of the activity of striatal neurons and, as a consequence, of motor behavior. Interestingly, striatal GSK-3 activity has recently been shown to be an important mediator of DA action on striatal function and behavior (Beaulieu *et al*, 2004). It is therefore

possible that the observed motor deficit also results from decreased DA-dependent striatal function and behavior in Tet/DN-GSK-3 mice. To explore whether Tet/DN-GSK-3 mice indeed show reduced striatal activation and reduced motor activity in response to DA, wild-type and Tet/DN-GSK-3 mice were challenged with amphetamine to induce a classic DA-dependent behavioral response. As shown in Figure 5A, *in vivo* microdialysis revealed that systemic administration of amphetamine (2.5 mg/kg, i.p.) induced a similar increase in extracellular DA levels in both groups of mice. Two-way ANOVA revealed a significant effect of amphetamine ($F_{1,15} = 3.76$, $P < 0.00002$), but no significant effect of genotype or genotype \times amphetamine interaction. The maximal effect on striatal DA levels was $224 \pm 41\%$ of baseline in wild-type mice and $229 \pm 39\%$ in transgenic mice. However, despite equivalent striatal DA release, this amphetamine challenge increased locomotor activity in wild-type but not Tet/DN-GSK-3 mice (Figure 5B). In good agreement, the amphetamine-induced expression of c-Fos (a marker of neuronal activity) in striatum was markedly lower in Tet/DN-GSK-3 (Figure 5C–F). Altogether, these results indicate that (a) the dopaminergic (presynaptic) component of the nigros-

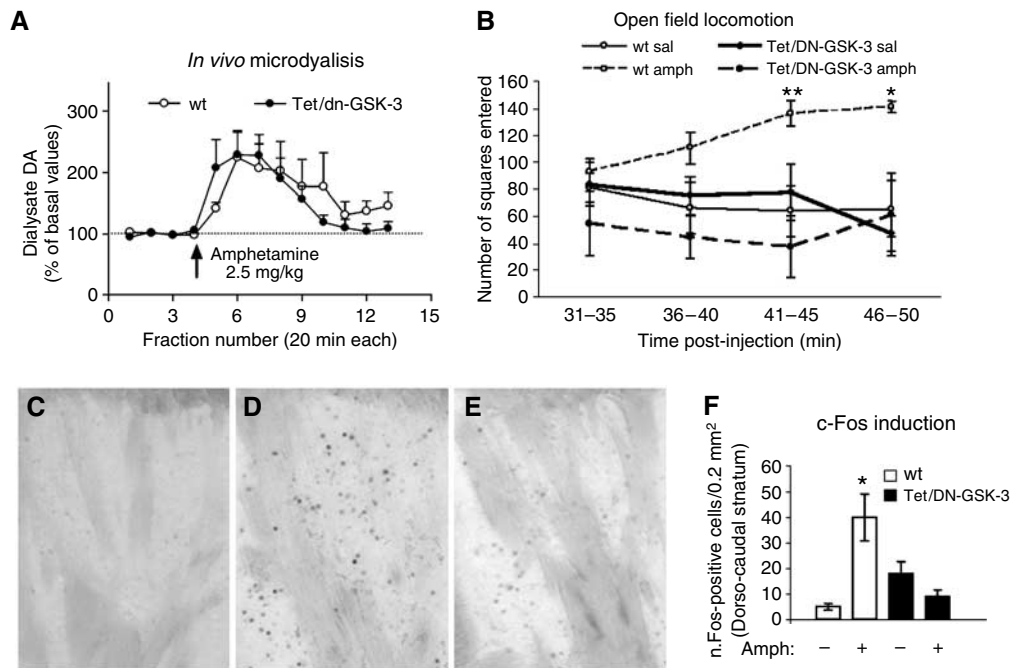


Figure 5 Reduced striatal c-Fos induction and reduced motor activity in response to a dopaminergic challenge. Amphetamine (2.5 mg/kg, i.p.) was administered to induce DA release in the striatum. (A) *In vivo* microdialysis: wild-type (wt) and Tet/DN-GSK-3 mice ($n=4$ and 8, respectively) were stereotactically implanted with microdialysis probes in the striatum. Dialysate fractions were collected every 20 min and the concentration of DA in dialysate samples was determined by HPLC. (B) Open field locomotion 31–50 min after saline or amphetamine i.p. injection to wt and Tet/DN-GSK-3 mice ($n=4$ and 8, respectively). (C–E) Representative images of immunohistochemistry of c-Fos in the striatum after 90 min of a saline injection to a wt mouse (C) or amphetamine (2.5 mg/kg i.p.) injections to a wt mouse (D) and a Tet/DN-GSK-3 mouse. (F) Histogram showing the quantification of the mean \pm s.e.m. number of c-Fos immunoreactive nuclei in the striatum of saline or amphetamine treated wt and Tet/DN-GSK-3 mice ($*P<0.05$).

striatal pathway is unaltered in Tet/DN-GSK-3 mice and (b) the reduction of DA-dependent behaviors in transgenic mice can be attributed to an attenuation of postsynaptic dopaminergic signalling resulting from the striatal expression of DN-GSK-3.

Reversal of motor deficit and of neuronal death in doxycycline-treated Tet/DN-GSK-3 mice

Selective GSK-3 inhibitors are under development for the treatment of chronic neurodegenerative and metabolic conditions (Cohen and Goedert, 2004). However, the above described toxicity for adult basal ganglia neurons elicited by DN-GSK-3 expression suggests possible motor side effects if selective GSK-3 inhibitors are given at excessive doses. This prompted us to explore whether the neuronal apoptosis and motor-deficit phenotype was susceptible to revert upon cessation of transgene expression by giving tetracyclines to symptomatic Tet/DN-GSK-3 mice. For this, we first verified that doxycycline administration results in efficient transgene shut-down in Tet/DN-GSK-3 mice as a first step before assessing whether restoration of normal GSK-3 levels would also result in normal GSK-3 activity. As expected, according to our previous experience in shutting down transgene expression in similar conditional mouse models (Yamamoto *et al*, 2000; Diaz-Hernandez *et al*, 2005; Engel *et al*, 2006), 6 weeks of a high dose of doxycycline (2 mg/ml in the drinking water) or 4 months of a low dose (0.5 mg/ml) led to undetectable levels of the reporter transgene expression in treated (Gene-Off) Tet/DN-GSK-3 mice (Figure 6A and B). Similarly, GSK-3 β and

p-GSK-3 levels were no longer increased respect to non-transgenic littermates (data not shown).

We then analyzed whether GSK-3 activity was susceptible to return to normal levels after doxycycline treatment. For this, untreated (Gene-On) and treated (Gene-Off) Tet/DN-GSK-3 mice and their respective control littermates were analyzed by *in vitro* GSK-3 enzymatic assays on striatal homogenates. As shown in Figure 6C, Gene-Off Tet/DN-GSK-3 mice showed significantly increased GSK-3 activity compared to Gene-On Tet/DN-GSK-3 mice and they were indistinguishable from their control littermates. This demonstrates that restoration of normal GSK-3 levels also results in normal GSK-3 activity.

This prompted us to analyze whether restoration of normal GSK-3 activity would also prevent the increased incidence of neuronal apoptosis detected in Tet/DN-GSK-3 mice. As shown in Figure 6D, the increase in the number of cleaved caspase-3-positive neurons observed in gene-On Tet/DN-GSK-3 mice was no longer detected in gene-Off Tet/DN-GSK-3 mice.

Finally, the potential reversibility of the Tet/DN-GSK-3 mouse motor phenotype was also explored. As shown in Figures 4A–C and 6E, 3-month-old Tet/DN-GSK-3 mice show a motor deficit in the rotarod apparatus. We then split the Tet/DN-GSK-3 mice shown in Figure 6E and their respective control littermates into two groups. One group was maintained without any pharmacological intervention and the other was given doxycycline in the low-dose administration paradigm (see Materials and methods) previously shown to

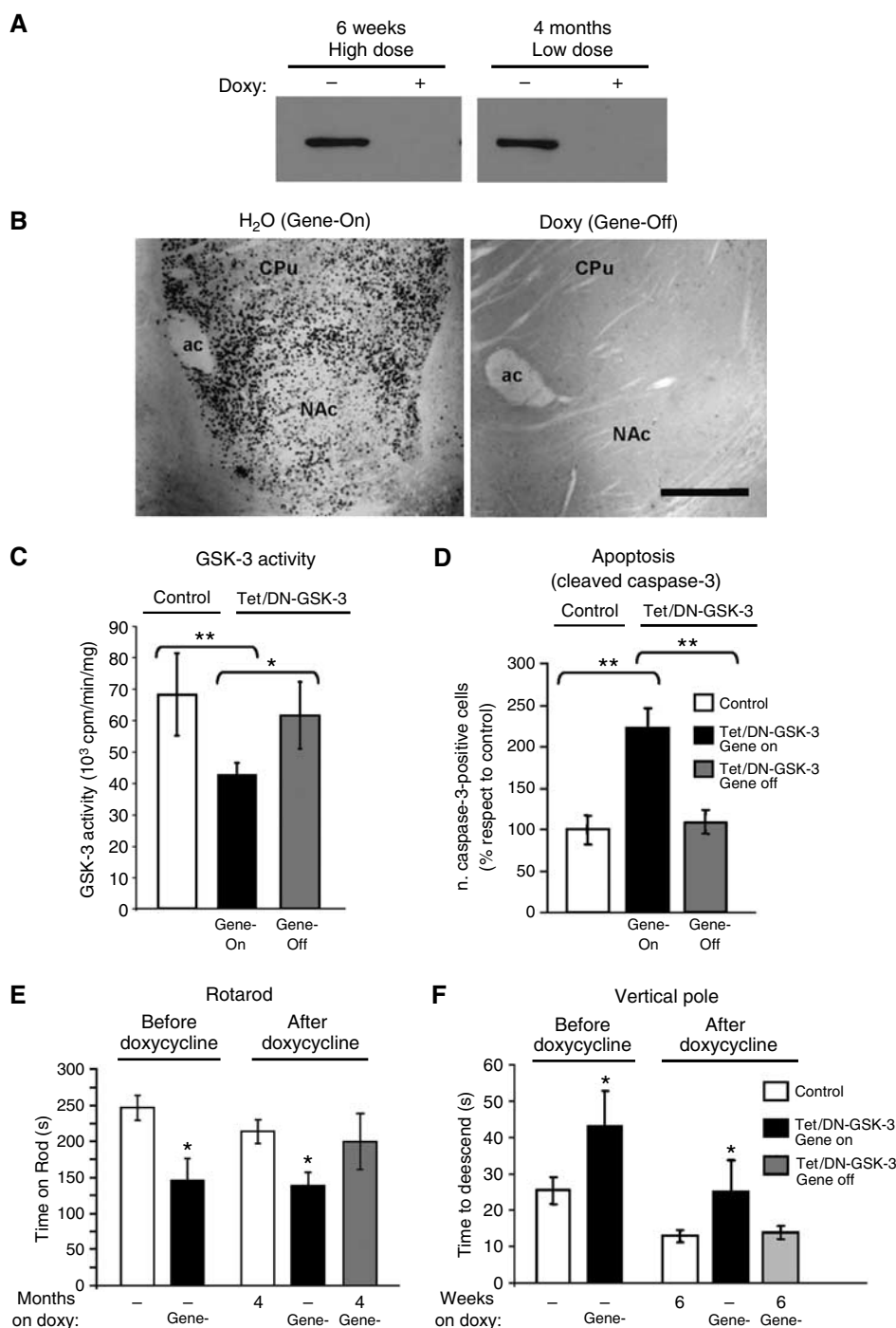


Figure 6 Effects of DN-GSK-3 expression revert after doxycycline treatment. (A) Western blot detection of β -gal in the striatum of Tet/DN-GSK-3 mice either untreated or doxycycline-treated for 6 weeks with the high-dose and for 4 months with the low-dose paradigms. (B) Immunohistochemistry of β -gal in the striatum of Tet/DN-GSK-3 mice either untreated (Gene-On) or treated (Gene-Off) with the high-doxycycline paradigm. Scale bar corresponds to 150 μ m. (C) *In vitro* GSK-3 activity assay on striatal homogenates. ($*P < 0.05$; $**P < 0.001$). (D) Immunohistochemical detection of cleaved caspase-3-positive cells in the striatum. The number of immunopositive cells in striatum per 30 μ m section from either gene-On or Gene-Off Tet/DN-GSK-3 mice was quantified and normalized with respect to control mice ($**P < 0.001$). (E) Performance on accelerating rotarod of wild-type and Tet/DN-GSK-3 mice at the age of 3 months, without pharmacological intervention and at the age of 7 months after the 4 month low-doxycycline paradigm. ($*P < 0.01$). (F) Performance on vertical pole of wild-type and Tet/DN-GSK-3 mice at the age of 3 months, without pharmacological intervention and at the age of 4.5 months after the 6 week high-doxycycline paradigm. ($*P < 0.01$).

efficiently stop transgene expression without affecting rotarod performance in control mice (Díaz-Hernández *et al*, 2005). Untreated (Gene-On) and treated (Gene-Off) Tet/DN-GSK-3 mice and their respective control littermates were then

retested every month in the accelerating rotarod test. Despite a tendency for improved rotarod performance over time after 1, 2 or 3 months of doxycycline treatment, this did not reach statistical significance (data not shown). However,

as shown in Figure 6E, after 4 months, Gene-off Tet/DN-GSK-3 mice showed a significantly better performance in rotarod compared to Gene-on Tet/DN-GSK-3, and they were indistinguishable from wild-type mice. Similarly, 6 weeks of 2 mg/ml doxycycline also resulted in reversal of the deficit observed in the vertical pole test and the average stride length was no longer significantly different between untreated (Gene-On) and treated (Gene-Off) Tet/DN-GSK-3 mice (Figure 6F and data not shown). Together, these results suggest that potential motor side effects of excessive pharmacological GSK-3 inhibition might be susceptible to revert.

Discussion

By generating conditional transgenic mice with expression of DN-GSK-3 in adult forebrain neurons, here we show that a sustained reduction in GSK-3 activity is deleterious for striatal and cortical neurons, as evidenced by histological detection of apoptosis and by a concomitant deficit in motor coordination. Interestingly, by shutting down DN-GSK-3 expression in symptomatic mice, we found that both the motor-impairment phenotype and the neuronal toxicity were susceptible to revert upon restoration of normal GSK-3 activity.

Extensive data have proposed GSK-3 inhibitors as neuroprotective and antiapoptotic agents (Frame and Cohen, 2001; Grimes and Jope, 2001; Beurel and Jope, 2006). Supporting reports explore many different apoptotic stimuli, including trophic support withdrawal, PI3-kinase inhibition, DNA damage, mitochondrial toxins, hypoxia/ischemia and glutamate excitotoxicity, among others (Pap and Cooper, 1998; Hetman *et al*, 2000; Beurel and Jope, 2006). However, decreased GSK-3 activity by disruption of the murine GSK-3 β gene was also known to result in embryonic lethality caused by massive apoptosis in liver during mid-gestation (Hoeftlich *et al*, 2000). Our results of neuronal apoptosis in striatum and cortex of Tet/DN-GSK-3 mice further confirm that chronically decreased GSK-3 activity compromises cell viability *in vivo* and extends this finding to adult tissues and post-mitotic cells such as neurons. In this regard, there is an apparent discrepancy between the regional extent of GSK-3 inhibition and of detection of apoptosis in Tet/DN-GSK-3 mice because apoptosis is found in cortex, where no significant decrease of GSK-3 activity is detected by enzymatic assays or by Ser21/9GSK-3 Western blot in cortical homogenates. This can be explained by the fact that, in the cortex only a fraction of neurons express the transgene. More precisely, expression is restricted to certain neurons within layers I–III. It is in these layers that increased apoptosis is detected by techniques with cellular resolution (e.g. cleaved caspase-3 staining). However, cortical homogenates for biochemical measurement of GSK-3 activity include layers IV–VI, as well as other non-expressing cells in layers I–III. Therefore, enzymatic activity measurements in cortical samples, despite showing a tendency towards decreased activity, do not detect the inhibition in specific transgene expressing neurons due to a dilution effect of those neurons within the whole homogenate.

There are also some reports of GSK-3 inhibitor treatment resulting in facilitation of apoptosis. More precisely, in apoptosis triggered in cultured cells by TNF α (Beyaert *et al*, 1989; Hoeftlich *et al*, 2000) or, including in neurons, by agonistic anti-Fas antibodies (Song *et al*, 2004; Beurel and Jope, 2006). Interestingly, an explanation for this paradoxical role of

GSK-3 activity and inhibition on apoptosis regulation has recently been proposed (Beurel and Jope, 2006). It seems that inhibition of GSK-3 activity facilitates apoptosis executed through the extrinsic (involving stimulation of death domain containing receptors) pathway, but prevents apoptosis execution if it is elicited through the intrinsic (mitochondria mediated) pathway. In view of this, it is therefore likely that embryonic hepatocytes and adult cortical and striatal neurons have in common a tonic influence of extracellular signals able to stimulate death domain containing receptors leading to a situation in which intact GSK-3 activity would be required to prevent apoptosis execution.

The results reported here are indicative of the effects of sustained GSK-3 inhibition and, to some extent, they may have implications when considering the potential side effects and the potential therapeutic efficacy of chronic administration of the potent and selective GSK-3 inhibitors that are currently under development for treatment of chronic conditions such as Alzheimer's disease, mood disorders and diabetes (Cohen and Goedert, 2004; Frame and Zheleva, 2006; Gould *et al*, 2006). However, it should also be noticed that drug administration can vary greatly from genetic inhibition in terms of the efficacy, retention and clearance and the specificity of treatments. Regarding possible side effects, as above mentioned, one of the *a priori* concerns is the tumorigenic potential of chronic GSK-3 inhibition (Polakis, 2000). In this regard, we did not find any evidence of tumor formation in Tet/DN-GSK-3 mice. However, this is not surprising, since transgene expression in these mice is restricted to neurons that are post-mitotic cells. Breeding DN-GSK-3 mice with driver mice expressing tTA under control of broader expression promoters will give a more comprehensive view of the tumorigenesis risk. Apoptosis, the other predicted potential side effect, is confirmed in neurons of Tet/DN-GSK-3 mice and therefore suggests potential neurological consequences of chronic GSK-3 inhibitor administration that are further supported by the motor phenotype. However, since the rationale for using GSK-3 inhibitors arises from the concept of aberrantly increased GSK-3 activity contributing to the etiology of various disorders, it is likely that these inhibitors will prove effective and safe if they are given to a dose that decreases GSK-3 activity without lowering it beyond its normal level.

Regarding the value of Tet/DN-GSK-3 mice in predicting the therapeutic potential of inhibitors, this can be explored by combining these mice with animal models of the various related disorders. In the case of Alzheimer's disease, GSK-3 has been linked to β -amyloid (A β) production from its precursor APP (Sun *et al*, 2002; Phiel *et al*, 2003; Ryder *et al*, 2003), to mediate A β -induced toxicity (Takashima *et al*, 1993; Alvarez *et al*, 1999), to contribute to mutant Presenilin-1 (PS-1) toxicity (Takashima *et al*, 1998), and to tau hyperphosphorylation (Hanger *et al*, 1992; Lovestone *et al*, 1994). Since Tet/DN-GSK-3 mice express the transgene in neurons of the brain regions affected in Alzheimer's disease, it would be interesting to combine them with any of the many available mouse models of Alzheimer's disease including those with modified expression of APP, PS-1, tau (Lim *et al*, 2001; Wong *et al*, 2002), or combinations of these (Engel *et al*, 2005). If neuropathology and/or learning deficit improve in the mice resulting from combining Alzheimer's disease models with Tet/DN-GSK-3 mice, this would strongly support the

therapeutic potential of GSK-3 inhibitors for this disease. However, to be predictive of the potential of GSK-3 inhibitors to treat metabolic disorders like diabetes, Tet/DN-GSK-3 mice should be generated with muscle and/or liver promoters to then be combined with chemical or transgenic models of diabetes.

The observed reduction in DA-dependent striatal induction of c-Fos and locomotor behavior in Tet/DN-GSK-3 mice fits well with the previously reported role of GSK-3 as an important mediator of DA actions in the striatum (Beaulieu *et al*, 2004). This, together with the here reported importance of intact GSK-3 activity for cortical and striatal neuron viability, may explain not only the motor deficit observed in Tet/DN-GSK-3 mice but also the tremor that appears as the most prominent motor side effect of the therapy of bipolar disorder with lithium, a well established GSK-3 inhibitor (Klein and Melton, 1996; Macritchie and Young, 2004).

In summary, the here reported generation and characterization of conditional transgenic mice with postnatal neuron expression of DN-GSK-3 revealed a key role of GSK-3 in adult neuron physiology and viability, and warns of potential neurological side effects of chronic administration of GSK-3 inhibitors. Interestingly, the reported reversibility data strongly support that such unwanted side effects are likely to revert if excessive GSK-3 inhibition is halted. Besides, the future combination of these DN-GSK-3 mice with mouse models of the various diseases linked to increased GSK-3 activity will help to elucidate the therapeutic potential of GSK-3 inhibitor therapies for each of these diseases.

Materials and methods

The Materials and methods are only described very briefly. For further information, see the Supplementary data section.

Generation of Tet/DN-GSK-3 mice

To generate Tet/DN-GSK-3 β mice, wild-type GSK-3 β sequence in the pBI-G-GSK-3 plasmid (Lucas *et al*, 2001) was replaced by the K85R-GSK-3 β sequence from the XGSK3 β -R85 plasmid (Munoz-Montano *et al*, 1999). The transgene fragment was microinjected into single cell FVB/N embryos. Four founder mice were identified by PCR and each founder line was amplified by backcrossing with wild-type FVB/N mice. The CamkII-Ta mouse line (Mayford *et al*, 1996) is maintained in a mixed CBAx57BL/6 background.

Doxycycline treatment

Tet/DN-GSK-3 β mice and their control littermates were given doxycycline (Sigma) (2 mg/ml) in drinking water *ad libitum* for 6 weeks. We have previously shown that this paradigm results in complete shut-down of the transgene in a similar conditional mouse model that overexpresses wild-type GSK-3 (Lucas *et al*, 2001; Engel *et al*, 2006). To explore reversal of rotarod phenotype, doxycycline was given at 2 mg/ml for 1 week, 1 mg/ml for a second week and 0.5 mg/ml the rest of the treatment session up to 4 months. This paradigm also results in complete transgene shut-down in Tet/DN-GSK-3 β mice, without worsening rotarod performance in wild-type mice (Díaz-Hernandez *et al*, 2005).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Brains were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and cryoprotected. Sagittal sections were pretreated for 30 min in 1% H₂O₂/PBS, followed by 1 h with 1% BSA, 5% FBS and 0.2% Triton X-100, incubated overnight with primary antibody and developed with the Elite Vectastain kit (Vector Laboratories) using diaminobenzidine (Sigma) and 0.003% H₂O₂. For immunofluorescence, after treatment with primary antibody, the sections were washed in PBS and incubated with the following secondary antibodies: goat anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen) and goat anti-mouse Alexa 594 (Invitrogen). Nuclei were stained by using DAPI (1:5000, Calbiochem).

TUNEL assay

Mice were anesthetized and transcardially perfused with 4% PFA in PBS for 10 min. Brains were post-fixed in 4% PFA for 2 h at 4°C and cryoprotected. Sections were treated following the protocol of the *In Situ* Cell Death Detection Kit, POD (Roche).

Western blot analysis

The protocols are described in detail in the Supplementary data section.

GSK-3 activity assay

Tissue was homogenized in 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM VO₄Na, 1% Triton 100-X, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and a cocktail of peptidase inhibitors (Roche). Supernatants were collected after centrifugation at 14 000 g for 15 min. The GS1 peptide (YRRAVPPSPSLSRHSSPHQS*EDEL) with phosphorylated ser21 was used as substrate (Stambolic and Woodgett, 1994). Supernatants were incubated at 37°C with GS1 peptide and [γ -³²P]ATP in 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT 10 mM MgCl₂ and either 20 mM NaCl or 20 mM LiCl. The assays were stopped by spotting aliquots on P81 phosphocellulose as described (Engel *et al*, 2006).

Behavioral testing

Open field locomotion: Major locomotor activity was tested as in the SHIRPA protocol (Rogers *et al*, 1997). Briefly, the arena (55 × 33 × 18 cm) is divided in equally-dimensioned squares (about 11 cm). Locomotion activity (as number of square entered with all the four paws) is counted during 5 min.

Rotarod test was performed with accelerating rotarod apparatus (Ugo Basile, Comerio, Italy). Mice were pretrained during 2 days. Then, the rotarod was set to accelerate from 4 to 40 r.p.m. over 5 min and mice were tested four times. During accelerating trials, the latency to fall from the rotarod was measured.

Vertical pole test was performed as described (Matsuura *et al*, 1997). The mouse was placed head-upward on the top of a vertical rough-surfaced pole (diameter 1 cm; height 50 cm) and the time until it descended to the floor was recorded, with a maximum duration of 120 s.

Footprint pattern test was performed as described (Barlow *et al*, 1996). The back paws of each mouse were dipped into ink and it was placed at the entrance of a dark tunnel (9.2 × 6.3 × 35.5 cm). The footprints were recorded on paper. Stride lengths were determined by measuring the distance between each step on the same side of the body.

In vivo microdialysis

Microdialysis was performed as described (Díaz-Mataix *et al*, 2005). Anesthetized mice were stereotactically implanted with microdialysis probes in the striatum at the following coordinates (in millimeters): AP +0.5, L -1.7, DV -4.5, according to the mouse atlas of Franklin and Paxinos (1997). Microdialysis was performed ~20 h after surgery. Probes were perfused with artificial cerebrospinal fluid. Dialysates were collected every 20 min. After a 100 min stabilization, four fractions were collected for basal values before systemic administration of amphetamine. Then, dialysis samples were collected. The DA concentration in dialysates was determined by HPLC.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

Acknowledgements

We thank Drs MR Fernandez, J Díaz-Nido and F Wandosell for helpful discussion, and Dr Peter Davies for kindly providing the PHF-1 antibody. We also thank Oscar Pintado for transgene-DNA microinjection and Javier Palacín, Desiree Ruiz, Raquel Cuadros and Elena Langa for technical assistance. This work was supported by Spanish Ministry of Science and Education (Grants: SAF 2004-05525 to FA, SAF2006-02424 to JA, and SAF 2003-04144 and SAF 2006-05995 to JLL), Comunidad de Madrid, Fundación 'La Caixa', Fundación Ramón Areces and Fondo de Investigaciones Sanitarias/isciii-CiberNed. Analía Bortolozzi is recipient of a Ramón y Cajal contract from MEC through IDIBAPS.

References

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* **16**: 3797–3804
- Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* **453**: 260–264
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* **84**: 361–384
- Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D, Wynshaw-Boris A (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86**: 159–171
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, Caron MG (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 5099–5104
- Beurel E, Jope RS (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* **79**: 173–189
- Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Suffys P, Van Roy F, Fiers W (1989) Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9494–9498
- Cohen P, Goedert M (2004) GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **3**: 479–487
- Diaz-Hernandez M, Torres-Peraza J, Salvatori-Abarca A, Moran MA, Gomez-Ramos P, Alberch J, Lucas JJ (2005) Full motor recovery despite striatal neuron loss and formation of irreversible amyloid-like inclusions in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* **25**: 9773–9781
- Díaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, Celada P, Artigas F (2005) Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity. Role in atypical antipsychotic action. *J Neurosci* **25**: 10831–10843
- Dominguez I, Itoh K, Sokol SY (1995) Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8498–8502
- Eldar-Finkelman H (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* **8**: 126–132
- Engel T, Hernandez F, Avila J, Lucas JJ (2006) Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* **26**: 5083–5090
- Engel T, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J, Hernandez F (2005) Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* **27**: 1258–1268
- Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* **359**: 1–16
- Frame S, Zheleva D (2006) Targeting glycogen synthase kinase-3 in insulin signalling. *Expert Opin Ther Targets* **10**: 429–444
- Franklin KBJ, Paxinos G (1997) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: San Diego
- Gingrich JR, Roder J (1998) Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice. *Annu Rev Neurosci* **21**: 377–405
- Gould TD, Picchini AM, Einat H, Manji HK (2006) Targeting glycogen synthase kinase-3 in the CNS: implications for the development of new treatments for mood disorders. *Curr Drug Targets* **7**: 1399–1409
- Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* **65**: 391–426
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* **147**: 58–62
- Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z (2000) Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* **20**: 2567–2574
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* **406**: 86–90
- Jope RS (2003) Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci* **24**: 441–443
- Jope RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* **29**: 95–102
- Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8455–8459
- Lewandoski M (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* **2**: 743–755
- Liang D, Li X, Clark JD (2004) Increased expression of Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II alpha during chronic morphine exposure. *Neuroscience* **123**: 769–775
- Lim F, Hernandez F, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J (2001) FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci* **18**: 702–714
- Lovestone S, Reynolds CH, Latimer D, Davis DR, Anderton BH, Gallo JM, Hanger D, Mulot S, Marquardt B, Stabel S, Woodgett JR, Miller CCJ (1994) Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* **4**: 1077–1086
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J* **20**: 27–39
- Macritchie KAN, Young AH (2004) Adverse syndromes associated with lithium. In: *Adverse Syndromes & Psychiatric Drugs. A Clinical Guide*, Haddad P, Dursun S, Deakin B (eds), pp 89–109. Oxford University Press: USA
- Matsuura K, Kabuto H, Makino H, Ogawa N (1997) Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *J Neurosci Methods* **73**: 45–48
- Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER (1996) Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* **274**: 1678–1683
- Munoz-Montano JR, Lim F, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J (1999) Glycogen synthase kinase-3 modulates neurite outgrowth in cultured neurons: possible implications for neurite pathology in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **1**: 361–378
- Pap M, Cooper GM (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* **273**: 19929–19932
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS (2003) GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* **423**: 435–439
- Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**: 1837–1851
- Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE (1997) Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* **8**: 711–713
- Ryder J, Su Y, Liu F, Li B, Zhou Y, Ni B (2003) Divergent roles of GSK3 and CDK5 in APP processing. *Biochem Biophys Res Commun* **312**: 922–929
- Song L, Zhou T, Jope RS (2004) Lithium facilitates apoptotic signaling induced by activation of the Fas death domain-containing receptor. *BMC Neurosci* **5**: 20
- Stambolic V, Woodgett JR (1994) Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* **303**: 701–704
- Sun X, Sato S, Murayama O, Murayama M, Park JM, Yamaguchi H, Takashima A (2002) Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100. *Neurosci Lett* **321**: 61–64
- Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9637–9641

- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7789–7793
- Wong PC, Cai H, Borchelt DR, Price DL (2002) Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* **5**: 633–639
- Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* **9**: 2431–2438
- Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* **101**: 57–66
- Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PS (2003) Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem* **278**: 33067–33077